

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Caroline Motta

**INCORPORAÇÃO DO ANTIOXIDANTE NATURAL  
 $\alpha$ -TOCOFEROL EM FILMES DE CARBOXIMETILCELULOSE**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós Graduação da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Química.

Orientador: Prof. Dr.Valdir Soldi

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Motta, Caroline

Incorporação do Antioxidante Natural a-Tocoferol em  
Filmes de Carboximetilcelulose [dissertação] / Caroline  
Motta ; orientador, Valdir Soldi - Florianópolis, SC, 2012.  
109 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.  
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Carboximetilcelulose. 3. a-Tocoferol. 4.  
Surfactantes. 5. Filmes poliméricos. I. Soldi, Valdir. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Química. III. Título.

Caroline Motta

**INCORPORAÇÃO DO ANTIOXIDANTE NATURAL  
 $\alpha$ -TOCOFEROL EM FILMES DE CARBOXIMETILCELULOSE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Química.

Florianópolis, 27 de julho de 2012.

---

Prof., Dr. Almir Spinelli  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof., Dr. Valdir Soldi  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof., Dr. Pedro Manique Barreto  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof., Dr. Vanderlei Gageiro Machado  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dra. Ledilege Cucco Porto  
Universidade Federal de Santa Catarina

---



Dedico este trabalho aos meus pais  
Levi e Regina pelo apoio e amor.



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado forças para nunca desistir apesar das dificuldades.

A toda minha família, em especial aos meus pais Levi e Regina, e a minha irmã Gislana, pelo amor, e principalmente pelo apoio nos momentos difíceis e pela compreensão quando eu estive ausente.

Ao professor Dr. Valdir Soldi pela oportunidade e pela confiança em mim depositada.

Aos grandes amigos do POLIMAT pelo apoio e companheirismo, em especial a Silvia Martelli, Ismael Bellettini e a Ana Cristina Pinheiro do Prado.

Aos indispensáveis amigos Marcela, Paulinha, Renatinha, Alessandra, Maria, Tiago, Dieguinho, Silvane, Vanessa, Julinho, Elaine e William e todos que eu posso ter esquecido. Afinal, ninguém é feliz sem ter amigos.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem gentilmente o convite.

Aos professores que contribuíram para minha formação.

Ao Departamento de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, por toda a atenção.

A Universidade Federal de Santa Catarina, pelo espaço físico concedido.





“Ser feliz sem motivo é a mais autêntica forma de felicidade.”

*Carlos Drummond de Andrade*

“É melhor ser alegre que ser triste  
A alegria é a melhor coisa que existe  
É assim como a luz no coração”

*Vinícius de Moraes – Samba de Benção*



## RESUMO

A incorporação de antioxidantes em filmes e recobrimentos comestíveis auxilia na prolongação da vida de prateleira dos alimentos retardando o processo de oxidação desses produtos. A função da vitamina E como antioxidante é desacelerar as reações de oxidação impedindo a propagação das reações via radicais livres. O  $\alpha$ -tocoferol (TC) é o antioxidante natural mais abundante, com maior bioatividade e biodisponibilidade. A carboximetilcelulose (CMC) é um polissacarídeo aniônico, linear, insípido, inodoro, solúvel em água, sendo amplamente utilizado em produtos alimentícios. O objetivo deste trabalho foi incorporar TC em filmes de CMC e avaliar a estabilidade química e as propriedades antioxidantes. Os filmes foram obtidos através da técnica de *casting*. As emulsões de CMC 2% (m/m) com o TC e os surfactantes, Tween 80 (TW) e lecitina com diferentes composições, foram preparadas em um Ultra-Turrax a 7500 rpm por 20 minutos. As emulsões secaram em placas de Petri por aproximadamente 6 dias. Medidas de fluorescência indicaram que o TC presente nos filmes permaneceu estável por todo o período analisado, o qual foi de 8 semanas. Filmes contendo CMC e TC sem os surfactantes apresentaram separação de fase na matriz. A análise morfológica demonstrou que os filmes contendo TW mostraram-se homogêneos, porém continham grandes cavidades, enquanto que nos filmes com TW e lecitina a homogeneidade se manteve, entretanto com poros muito menores. Na análise de cor, os filmes apresentaram-se transparentes, sem grandes variações de cor. No que diz respeito a permeabilidade ao vapor de água (PVA), os filmes contendo TW e lecitina apresentaram valores de permeabilidade próximos ao da CMC pura, demonstrando que não houve rompimento da matriz polimérica. As propriedades mecânicas dos filmes também sofreram alterações com as adições, uma vez que com o aumento da concentração dos surfactantes, houve um decréscimo nos valores do módulo de Young e tensão de ruptura, e consequentemente, ocorreu um aumento no alongamento máximo. Nas análises de perfil de liberação e atividade antioxidante, os filmes apresentaram valores superiores para as amostras que continham lecitina em sua formulação, o que pode ser explicado pela interação entre a lecitina e o TC e sua afinidade com o etanol. Conclui-se que, os sistemas aqui estudados apresentam potencial aplicação para embalagens biodegradáveis na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:**  $\alpha$ -Tocoferol, CMC, Lecitina, Tween 80.



## ABSTRACT

The incorporation of antioxidants into edible films and coatings helps to extend the product shelf-life by retarding oxidation processes in food products. Vitamin E functions as a chain-breaking antioxidant that prevents the propagation of free radical reactions. The most naturally abundant form is  $\alpha$ -tocopherol (TC), which is also the most biologically active and most bio-available. Carboxymethyl cellulose (CMC) is a linear, long-chain, water-soluble, anionic polysaccharide, tasteless, odorless, free-flowing powder and has wide application in foods. The objective of this work was to incorporate TC in CMC films and assess its chemical stability and antioxidant properties. Films were obtained by casting technique. For each film, 2g of CMC were solubilized for 24 h at 60°C and 250 rpm. After that, TC and surfactants with different compositions, were emulsified in an Ultra-Turrax at 7500rpm for 20min. The filmogenic solution was then casted in Petri dishes and dried during 6 days at ambient temperature. The surfactants used were Polysorbate 80 (TW) and Lecithin (LC). Fluorescence measurements were made to monitor the stability of  $\alpha$ -tocopherol present in the films for 8 weeks, which showed good stability during the studied period. Films containing CMC and TC without surfactants showed a clear phase separation between TC and the CMC matrix. The morphological analysis showed that films containing TW were homogeneous, but contained large cavities, while in the films containing lecithin and TW, the homogeneity is maintained, although with much smaller pores. In colorimetric analysis, the films were transparent, without major variations in color. Regarding the water vapor permeability (PVA), films containing lecithin and TW showed PVA values close to that of pure CMC, indicating that no break of the polymer matrix has occurred. The mechanical properties of films have also changed with the compound addition, since an increasing concentration of the surfactants causes a decrease in the values of Young's modulus and tensile strength, and also increase in elongation, typically of plasticizers. In the analysis of the release profile and antioxidant activity of TC, the films showed higher values for both properties for samples containing lecithin in its formulation, which can be explained by the interaction between lecithin and TC and its affinity with ethanol. It is concluded that the systems studied here have potential application for edible coatings.

**Keywords:**  $\alpha$ -tocopherol , CMC, Tween 80, Lecithin



## LISTA DE FIGURAS

|                  |   |              |
|------------------|---|--------------|
| <b>Figura 1</b>  | Esquema representativo das etapas do processo de oxidação de um ácido graxo insaturado.   | Pág. 54      |
| <b>Figura 2</b>  | Estrutura química dos componentes da vitamina E: (a) anel cromanol do tocoferol (b) tocoferóis e (c) tocotrienóis, bem como os grupos presentes em cada uma das formas $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ e $\delta$ . | Pág. 56 e 57 |
| <b>Figura 3</b>  | Tipos de emulsão: O/W e W/O.  | Pág. 60      |
| <b>Figura 4</b>  | Estrutura molecular do tween 80.  | Pág. 61      |
| <b>Figura 5</b>  | Estrutura química da fosfatidilcolina, encontrada em maiores concentrações na lecitina de soja.   | Pág. 63      |
| <b>Figura 6</b>  | Estrutura química do polissacarídeo (a) celulose e (b) carboximetilcelulose.  | Pág. 65      |
| <b>Figura 7</b>  | Esquema da reação de formação da CMC.   | Pág. 66      |
| <b>Figura 8</b>  | Esquema de cores do método CIELAB.  | Pág. 73      |
| <b>Figura 9</b>  | Estrutura molecular do antioxidante sintético Trolox.   | Pág. 74      |
| <b>Figura 10</b> | Estrutura molecular do ABTS e reação de estabilização.  | Pág. 75      |
| <b>Figura 11</b> | Estrutura molecular do DPPH e reação de estabilização.  | Pág. 75      |
| <b>Figura 12</b> | Espectro de emissão de fluorescência dos filmes A, D, P, O, H, K, TC-degradado.   | Pág. 77      |
| <b>Figura 13</b> | Gráfico de intensidade máxima fixada em 326 nm <i>versus</i> tempo de análise para os filmes: a) A, F, H e I; b) A, K, M e N.   | Pág. 78      |
| <b>Figura 14</b> | Esquema da interação por ligações de hidrogênio entre a molécula de fosfatidilcolina da lecitina com o TC.  | Pág. 79      |
| <b>Figura 15</b> | Espectro no infravermelho dos filmes A e B.   | Pág. 80      |
| <b>Figura 16</b> | Espectro no infravermelho dos filmes A, B, D, M e N no comprimento de onda entre 900 e 1200 $\text{cm}^{-1}$ .  | Pág. 80      |
| <b>Figura 17</b> | a) e b) Superfície, c) e d) Fratura dos filmes A (CMC pura) e B (CMC e TC) com aumento de 1000x.  | Pág. 81      |
| <b>Figura 18</b> | Superfície do filme D (1000x).  | Pág. 82      |
| <b>Figura 19</b> | a) Superfície e b) Fratura criogênica do filme F (1000x).   | Pág. 82      |
| <b>Figura 20</b> | Fratura criogênica dos filmes de CMC com TC e TW: H e I.  | Pág. 83      |
| <b>Figura 21</b> | Fratura criogênica dos filmes de CMC com TC, lecitina e TW: K, L, M e N.  | Pág. 83 e 84 |
| <b>Figura 22</b> | Possíveis reações de oxidação do TC na presença de $\text{O}_2$ .   | Pág. 99      |





## LISTA DE TABELAS

|                 |   |         |
|-----------------|---|---------|
| <b>Tabela 1</b> | Exemplos de dispersões coloidais.   | Pág. 59 |
| <b>Tabela 2</b> | Composição química típica (%) da lecitina de soja   | Pág. 63 |
| <b>Tabela 3</b> | Composição em massa dos filmes de CMC com TW e Lecitina de soja.  | Pág. 70 |
| <b>Tabela 4</b> | Propriedades mecânicas e PVA dos filmes de CMC com TC e surfactantes.   | Pág.89  |
| <b>Tabela 5</b> | Valores da avaliação instrumental da cor dos filmes de CMC através do sistema CIELAB (Comission Internationale de Eclairage). | Pág.93  |
| <b>Tabela 6</b> | Perfil de liberação dos filmes.   | Pág. 95 |
| <b>Tabela 7</b> | Atividade antioxidante da solução da análise de liberação dos filmes em etanol, determinada pelos sistemas e ABTS.            | Pág. 96 |
| <b>Tabela 8</b> | Atividade antioxidante da solução da análise de liberação dos filmes em etanol, determinada pelos sistemas e DPPH.            | Pág. 97 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>A/O</b>                 | Emulsão água em óleo  |
| <b>ABTS</b>                | [2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]  |
| <b>BHA</b>                 | Butilato de hidroxianisol                                   |
| <b>BHT</b>                 | di-terc-butil metil fenol (butilato de hidroxitolueno)      |
| <b>CIELAB</b>              | Comission Internationale de Eclairage                       |
| <b>CMC</b>                 | Carboximetilcelulose  |
| <b>DPPH</b>                | (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)                             |
| <b>DS</b>                  | Grau de substuição  |
| <b>FDA</b>                 | Food and Drugs Administration                               |
| <b>FTIR</b>                | Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier |
| <b>GRAS</b>                | Generally Recognized as Safe                                |
| <b>HLB</b>                 | Balanco lipofílico hidrofílico                              |
| <b>HPLC</b>                | Cromatografia líquida de alta performance                   |
| <b>HPMC</b>                | Hidroxipropilmetilcelulose                                  |
| <b>LOD</b>                 | Limite de detecção  |
| <b>LOQ</b>                 | Limite de quantificação                                     |
| <b>MEV</b>                 | Microscopia eletrônica de varredura                         |
| <b>M<sub>w</sub></b>       | Massa molecular   |
| <b>N</b>                   | Newton  |
| <b>O/A</b>                 | Emulsão óleo em água  |
| <b>P.A.</b>                | Padrão analítico  |
| <b>PEBD</b>                | Polietileno de baixa densidade                              |
| <b>PG</b>                  | Propil galato   |
| <b>PP</b>                  | Polipropileno   |
| <b>PVA</b>                 | Permeabilidade ao vapor de água                             |
| <b>rpm</b>                 | Rotações por minuto   |
| <b>TBHQ</b>                | terc-butil-hidroquinona                                     |
| <b>TEAC</b>                | Capacidade antioxidante equivalente em Trolox               |
| <b>TC</b>                  | $\alpha$ -tocoferol   |
| <b>TW</b>                  | Tween 80  |
| <b>UR</b>                  | Umidade relativa  |
| <b>UV</b>                  | Ultravioleta  |
| <b><math>\alpha</math></b> | Alfa  |
| <b><math>\beta</math></b>  | Beta  |
| <b><math>\gamma</math></b> | Gama  |
| <b><math>\delta</math></b> | Delta   |



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  | <b>47</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b>  | <b>51</b> |
| 2.1 Objetivos Específicos  | 51        |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>   | <b>53</b> |
| 3.1 Aditivos alimentares: Antioxidantes  | 53        |
| <b>3.1.1 Vitamina E: <math>\alpha</math>-Tocoferol (TC)</b>                                  | <b>55</b> |
| 3.2 Sistemas Coloidais   | 59        |
| 3.3 Emulsões: Surfactantes   | 59        |
| <b>3.3.1 Polissorbato 80 (Tween 80 - TW)</b>   | <b>61</b> |
| <b>3.3.2 Lecitina</b>  | <b>62</b> |
| 3.4 Polímeros  | 64        |
| <b>2.4.1 Carboximetilcelulose (CMC)</b>  | <b>65</b> |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>   | <b>69</b> |
| 4.1 Materiais  | 69        |
| 4.2 Métodos  | 69        |
| <b>4.2.1 Obtenção dos filmes CMC por emulsão</b>   | <b>69</b> |
| <b>4.2.2 Avaliação da estabilidade do <math>\alpha</math>-tocoferol na matriz polimérica</b> | <b>70</b> |
| 4.2.2.1 Análise de fluorescência   | 70        |
| 4.2.2.2 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)   | 71        |
| <b>4.2.3 Caracterização dos filmes</b>   | <b>71</b> |
| 4.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)  | 71        |
| 4.2.3.2 Análise mecânica   | 71        |
| 4.2.3.3 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)   | 71        |
| 4.2.3.4 Análise Colorimétrica  | 72        |
| 4.2.3.5 Testes de liberação do $\alpha$ -tocoferol dos filmes de CMC                         | 73        |
| 4.2.3.6 Atividade antioxidante do $\alpha$ -tocoferol (DPPH e ABTS)                          | 74        |
| 4.2.3.7 Análise estatística  | 76        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>77</b> |
| 5.1 Incorporação do antioxidante $\alpha$ -tocoferol na matriz polimérica de CMC por emulsão | 77        |
| 5.2 Avaliação da estabilidade do $\alpha$ -tocoferol na matriz polimérica                    | 77        |
| <b>5.2.1 Análise de fluorescência</b>  | <b>77</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>5.2.2 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)</b>  | <b>79</b>  |
| 5.3 Caracterização dos filmes  | 81         |
| <b>5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b>   | <b>81</b>  |
| <b>5.3.2 Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água (PVA)</b>  | <b>84</b>  |
| <b>5.3.4 Análise colorimétrica</b>   | <b>90</b>  |
| <b>5.3.5 Testes de liberação e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) do <math>\alpha</math>-tocoferol nos filmes de CMC</b> | <b>94</b>  |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>  | <b>101</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>103</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Os óleos e gorduras fazem parte de um grupo de compostos denominados lipídeos. Os lipídeos estão presentes em uma vasta gama de alimentos e são passíveis de diversas alterações durante o processamento, armazenamento e consumo do alimento, gerando substâncias desejáveis ou não ao sabor (Araújo 2008). Nos alimentos, os lipídeos desempenham funções importantes contribuindo para a qualidade do alimento, aos quais conferem características específicas que o tornam desejável, como sabor, aroma, cor e textura. Os lipídeos também possuem valor nutricional importante, pois servem como fonte de energia para o metabolismo, como meio de transporte de vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais, como o linoléico, linolênico e araquidônico (StAngelo 1996). Quando oxidados, os lipídeos originam produtos primários e secundários que afetam negativamente estas funções. Além disso, as reações de oxidação de gorduras no organismo humano têm sido associadas a diversas doenças tais como: aterosclerose, câncer, diabetes, estresse psicológico, infecções e intoxicações farmacológicas (Ferrari 1998). Surge então a necessidade de proteger a integridade química dos lipídeos.

Antioxidantes são substâncias que quando presentes nos alimentos em baixas concentrações retardam significativamente ou previnem a oxidação do alimento. A vitamina E é um antioxidante natural que ajuda a proteger o corpo da ação dos radicais livres. É considerada a mais efetiva e o mais abundante antioxidante lipossolúvel presente em membranas celulares de mamíferos, atuando na proteção contra a lipoperoxidação e evitando a formação de radicais peróxidos a partir de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas fosfolipídicas, convertendo-os em produtos mais estáveis (Montero, Marrero et al. 1999). O  $\alpha$ -tocoferol (TC), maior componente presente na vitamina E, destaca-se como um potente estabilizador de radicais livres. É um antioxidante primário (transfere átomos de hidrogênio para o radical peroxil formado) e um dos compostos naturais com maior poder antioxidante, sendo comparado aos antioxidantes sintéticos como o di-terc-butil metil fenol (*Butylated hydroxytoluene* - BHT).

Em geral, a oxidação lipídica ocorre em três estágios: iniciação, propagação e terminação (Araújo 2008). Uma vez que a velocidade das reações de oxidação aumenta exponencialmente após o estágio inicial, os antioxidantes agem no estado inicial da reação. Também conhecido como período de indução da oxidação (indicador da vida-de-prateleira do produto), esta etapa inicial sequestra os radicais livres,

interrompendo as reações de cadeia aumentando então a vida útil do alimento. Os antioxidantes podem ser adicionados ao alimento pela *adição instantânea* ou *liberação controlada*. A *adição instantânea* ocorre quando todo o antioxidante é adicionado ao alimento instantaneamente ou em um curto espaço de tempo. Na *liberação controlada* os antioxidantes são adicionados aos alimentos de forma contínua através do uso de embalagens ativas ou coberturas comestíveis para prolongar a estabilidade do alimento (LaCoste, Schaich et al. 2005; Nerin, Tovar et al. 2006).

O TC pode ser utilizado como antioxidante contido em embalagens ativas de alimentos (Wessling, Nielsen et al. 2000; Wessling, Nielsen et al. 2001). Entretanto, a eficiência do TC quando incorporado em filmes poliméricos varia com o alimento, o tipo de embalagem e as condições de estocagem (Lee, Shin et al. 2004; Zoraida Graciano-Verdugo, Soto-Valdez et al. 2010). Filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) contendo TC se mostraram efetivos na inibição da oxidação de ácido linoleico a 6 °C, na ausência de luz (Wessling, Nielsen et al. 2000). Deve-se considerar que a taxa de liberação do material na embalagem para o alimento têm grande influência na eficiência do TC como antioxidante (Lee, Shin et al. 2004). E a taxa de liberação do TC para o alimento depende da matriz polimérica na qual está inserido. Segundo (Zhu, Lee et al. 2012), o TC pode ser liberado rapidamente de matrizes poliméricas como o PEBD e vagorosamente de matrizes como o polipropileno (PP), devido a diferenças de cristalinidade. Sendo o PP mais cristalino, o caminho percorrido pelo TC para sair da matriz polimérica aumenta (Zhu, Lee et al. 2012). O controle da taxa de liberação dos antioxidantes é um fator importante que determina sua eficiência no combate a oxidação lipídica (Koontz, Moffitt et al. 2010).

Coberturas comestíveis podem ser obtidas a partir de polímeros naturais, tais como proteínas, derivados de celulose e polissacarídeos. Coberturas e filmes comestíveis se diferenciam apenas no fato de que o a primeira é aplicada ainda no estado líquido sobre o produto e o segundo é utilizado já na forma de filme, para o acondicionamento de alimentos. Filmes comestíveis compostos de proteínas, polissacarídeos ou lipídios, aumentam a qualidade dos alimentos ao mesmo tempo que minimizam cuidados especiais com a embalagem final (CHEN, 1995). Com o intuito de proteger e estender a vida útil de alimentos ricos em óleos (como amendoins, nozes, castanhas, etc.), o desenvolvimento e aplicação de coberturas comestíveis vem apresentando um crescimento



acentuado, com a utilização de polímeros naturais comestíveis como matrizes.

A celulose é o polímero natural mais abundante do planeta e é encontrado na forma de microfibrilas que formam uma estrutura rígida na parede celular das plantas (Ferreira, Rocha et al. 2009). A carboximetilcelulose (CMC) é obtida a partir da modificação química da celulose, através da reação do ácido cloroacético ou seu sal (cloroacetato de sódio) com a celulose alcalinizada. A CMC é um copolímero biodegradável que apresenta duas unidades de repetição distribuídas de maneira randômica ao longo da cadeia macromolecular:  $\beta$ -D-glicose e  $\beta$ -D-glucopyranose 2-O-(carboximetil)-sal monossódico, unidas através de ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (Fujimoto, Reis et al. 2002; Yasar, Togrul et al. 2007).

Wamburra *et al* (2010) desenvolveram coberturas a partir de CMC contendo TC sintético, extrato de jujuba e extrato de romã para recobrir amendoins torrados. Os resultados demonstraram que tanto os filmes de CMC pura quanto as coberturas contendo os extratos de jujuba e romã foram efetivas na prevenção da oxidação lipídica dos amendoins. No entanto, quando foi utilizado TC nas formulações dos filmes, os efeitos foram negativos e a oxidação aconteceu mais rapidamente. Em outro estudo realizado por Wamburra *et al.*, a introdução de TC sintético em coberturas comestíveis de CMC não afetou significativamente a estabilidade do amendoim, ao contrário, o uso de extratos de Rosemary e chá contendo TC tiveram ação antioxidante comprovada quando utilizadas na cobertura do alimento (Wambura, Yang et al. 2011).

Os trabalhos acima citados limitam-se a comparação dos diferentes extratos antioxidantes, utilizando a CMC como matriz polimérica hidrofílica, sem, no entanto fornecer informações que justifiquem o fato de um antioxidante como o TC, reconhecido por sua alta atividade de estabilização de radicais livres, não ter efeito positivo quando utilizado em coberturas comestíveis. Desta forma, este trabalho teve como proposta principal, o desenvolvimento de filmes comestíveis a partir de CMC contendo TC. Ênfase é dada principalmente: i) ao estudo de como a presença do TC influencia as propriedades físico-químicas dos filmes (mecânicas, de barreira, etc.), ii) a existência ou não de interação do TC com o polímero CMC e iii) ao entendimento dos fatores que influenciam a estabilidade e a ação antioxidante do TC quando presente em uma matriz polimérica hidrofílica.



## 2 OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar filmes de CMC, através da técnica de *casting*, contendo o antioxidante natural  $\alpha$ -tocoferol, com o intuito de avaliar a influência desse agente ativo nas propriedades dos filmes, mecanismo de liberação e estabilidade na matriz polimérica.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Preparar filmes de CMC contendo o antioxidante natural TC através da técnica de evaporação do solvente (*casting*);
- Estudar o efeito da composição das formulações sobre a homogeneidade do TC na matriz polimérica;
- Avaliar a estabilidade do TC na matriz polimérica de CMC através da análise de fluorescência;
- Identificar os grupos funcionais e seus possíveis deslocamentos nos filmes de CMC a partir da obtenção de espectros no infravermelho (FTIR) dos filmes;
- Avaliar a morfologia dos filmes através da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a influência da adição do TC e dos surfactantes na permeabilidade a vapor de água (PVA) e nas propriedades mecânicas dos filmes de CMC;
- Avaliar a influência da adição de TC e dos surfactantes na coloração dos filmes através da análise de cor;
- Avaliar o perfil de liberação do TC incorporados nos filmes de CMC contendo TW e lecitina;
- Avaliar a atividade antioxidante do TC em etanol através dos testes com os radicais ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila);



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Aditivos alimentares: Antioxidantes

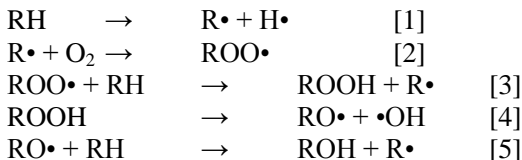
Devido aos avanços tecnológicos e às mudanças nos padrões alimentares nas últimas décadas, diversos tipos de alimentos têm sido produzidos a fim de atender a demanda do consumidor por alimentos mais nutritivos, seguros e acessíveis. Na tentativa de satisfazer essas exigências, aditivos alimentares (tanto de origem sintética quanto natural) vêm sendo amplamente produzidos e estudados, tornando-se indispensáveis na produção de alimentos processados. (Shim, Seo et al. 2011)

A deterioração oxidativa dos lipídios é uma das maiores preocupações durante a vida de prateleira dos alimentos. As reações oxidativas diminuem a segurança e qualidade dos alimentos devido à formação de produtos tóxicos, espécies reativas de oxigênio e produtos de reação secundária durante seu processamento e cozimento. (Lee and Shibamoto 2002)

As espécies reativas de oxigênio (radicais livres) são moléculas ou fragmentos moleculares altamente reativos que apresentam em sua estrutura elétrons desemparelhados provenientes do processo de oxidação. Estas espécies reativas, tais como os radicais óxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxidos ( $ROO^{\cdot}$ ), hidroxilas ( $^{\cdot}OH$ ) (Figura 1), vêm sendo associadas à carcinogênese, além de provocarem doenças coronárias e outros problemas de saúde associados à idade. (Borneo, Leon et al. 2009; Byun, Hwang et al. 2011)

Na Figura 1 pode ser observado o mecanismo proposto para a autooxidação, com as reações de iniciação, propagação e terminação. No processo de iniciação, o átomo de hidrogênio  $\alpha$ -metilênico é abstraído da molécula lipídica para formar um radical livre alquil ( $R^{\cdot}$ ) [1]. O radical lipídico é altamente reativo podendo reagir com o oxigênio atmosférico ( $O_2$ ), produzindo um radical peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ) [2]. Nas reações de propagação, o radical peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ) reage com outra molécula de lipídio insaturado para formar um hidroperóxido e um novo radical lipídico instável [3]. Como um novo radical livre é gerado a cada passo, mais oxigênio é incorporado no sistema, resultando num mecanismo de reação cíclica [4]. Hidroperóxidos são instáveis e podem degradar para radicais que aceleram a reação de propagação [5]. A terminação ocorre somente quando dois radicais livres se combinam para formar um produto não radicalar. (Wanasundara e Shahidi, 2005)

I (iniciador)



**Figura 1:** Esquema representativo das etapas do processo de oxidação de um ácido graxo insaturado. (Prado 2008)

Além das espécies de oxigênio reativas serem prejudiciais à saúde, a deterioração oxidativa dos componentes dos alimentos é responsável pela geração de odores e sabores rançosos (*off-flavors*). Isso diminui as qualidades organolépticas e nutricionais dos alimentos processados, causando mudança na sua coloração e textura. Com isso, a recomendação para o consumo de alimentos ricos em antioxidantes vem aumentando a cada dia, uma vez que estes compostos auxiliam no impedimento das reações de oxidação durante o processo e armazenamento. Além disso, a maior parte destes antioxidantes não são prejudiciais à saúde. (Kranl, Schlesier et al. 2005; Borneo, Leon et al. 2009)

Antioxidantes são substâncias de fonte natural ou sintética que retardam o início da oxidação ou diminuem a taxa com a qual as reações oxidativas ocorrem, reprimindo a ação dos radicais livres. Sua principal função é manter a qualidade e estender a vida de prateleira do alimento, através da prevenção ou retardo da oxidação de ácidos graxos instáveis e componentes lipossolúveis. (Eitenmiller and Lee 2004)

De acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em *primários* ou *secundários*. Alguns antioxidantes apresentam ainda mais de um mecanismo de atividade, e por isso, são geralmente referenciados como *antioxidantes de múltipla função*. (Eitenmiller and Lee 2004; Luzia and Jorge 2009)

Os antioxidantes primários são compostos que retardam ou interrompem a etapa de iniciação ou de propagação da reação de oxidação. Isso ocorre através da doação de elétrons ou átomo hidrogênio aos radicais livres originários do alimento, convertendo-os em produtos termodinamicamente mais estáveis. O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é sequestrado pelos radicais livres  $\text{R}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$  e  $\text{ROO}\cdot$  com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim, formam-se espécies inativas ( $\text{ROOH}$ ,  $\text{ROH}$  e  $\text{RH}$ ) para a propagação da reação em cadeia e também um radical relativamente estável ( $\text{A}\cdot$ ) procedente do antioxidante (capaz de participar de reações de terminação). Os compostos butilato de hidroxitolueno (BHT),

butilato de hidroxianisol (BHA) e propil galato (PG), etoxiquin, e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) são os principais exemplos de antioxidantes primários. Dentre os antioxidantes naturais, os tocoferóis são os mais usados. (Eitenmiller and Lee 2004; Luzia and Jorge 2009)

Os antioxidantes secundários são compostos que retardam a reação de auto-oxidação por diferentes mecanismos, dentre eles: complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete. Estes antioxidantes são geralmente referenciados como compostos sinérgicos, pois promovem a atividade dos antioxidantes primários. Ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido tartárico são exemplos usuais de compostos que apresentam esta sinergia. (Eitenmiller and Lee 2004; Luzia and Jorge 2009)

Na tentativa de prevenir a oxidação lipídica, antioxidantes sintéticos como o BHT, BHA e o PG têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos. Contudo, várias pesquisas apontam esta classe de antioxidantes como carcinogênicos, uma vez que a segurança com relação ao uso de tais compostos em alimentos vem sendo questionada por apresentarem potenciais riscos à saúde humana. Além dessas pesquisas, o interesse do consumidor por produtos naturais têm reforçado a necessidade de antioxidantes de fonte natural como uma alternativa eficaz para prevenir a deterioração de alimentos durante seu processamento e armazenamento. (Moure, Cruz et al. 2001; Lee and Shibamoto 2002; Borneo, Leon et al. 2009)

Os antioxidantes naturais de origem vegetal são geralmente classificados como vitaminas, compostos fenólicos (incluindo flavonoides) e componentes voláteis de ervas e especiarias. Estes antioxidantes têm se tornando cada vez mais atrativos não somente na indústria alimentícia, mas também na medicina preventiva por serem considerados uma das mais importantes fontes de cura de doenças associadas aos danos oxidativos. Como reflexo dessas propriedades, observa-se atualmente um aumento no número de trabalhos científicos que relatam os benefícios desses antioxidantes naturais à saúde. (Lee and Shibamoto 2002; Borneo, Leon et al. 2009)

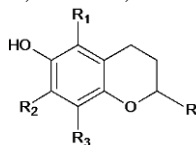
### **3.1.1 Vitamina E: $\alpha$ -Tocoferol (TC)**

Desempenhando papel fundamental no metabolismo das células, a vitamina E apresenta como uma de suas características principais atividade antioxidante capaz de interromper reações de cadeia e prevenir a oxidação lipídica. Assim, este composto vem sendo

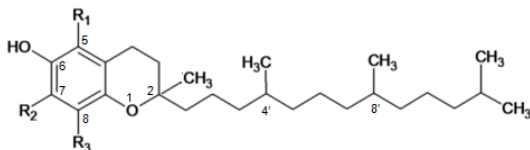
amplamente utilizado em suplementos vitamínicos e como antioxidantes nas indústrias de cosméticos e fármacos. (Cheong, Tan et al. 2008; Byun, Hwang et al. 2011)

Primeiramente denominada como *fator X* (ou *fator de antiesterilidade*), a vitamina E foi descoberta e caracterizada como um nutriente lipossolúvel por Evans e Bishop em 1922. Em um estudo sobre a influência da alimentação dos ratos na reprodução desses animais, esses cientistas observaram que quando os animais eram alimentados com manteiga rançosa os ratos apresentavam problemas em sua reprodução. Fato que não foi observado nos animais alimentados com trigo e vegetais frescos. Em 1936 o componente ativo da vitamina E foi isolado do óleo de gérmen de trigo, e em 1938 a estrutura desse componente foi determinada. Entretanto, somente em 1947 os tocoferóis foram reconhecidos como antioxidantes, sendo o TC aquele com maior eficiência na prevenção de deficiências de vitamina E. (Eitenmiller and Lee 2004; Zingg 2007)

A vitamina E de fonte natural apresenta oito diferentes componentes em sua composição: os ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -) tocoferóis, e o ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -) tocotrienóis (Figura 2). Estes componentes apresentam em sua estrutura o anel hidrofílico cromanol (Figura 2a), ligado à uma cadeia de 16 carbonos, isoprênica e hidrofóbica. Os tocotrienóis possuem três insaturações (carbonos 3', 7' e 11') na cadeia isoprênica, enquanto os tocoferóis não apresentam insaturações e possuem três centros quirais (carbono 2, 4', 8') em sua estrutura, todos de configuração R. (Zingg 2007; Sabliov, Fronczek et al. 2009)

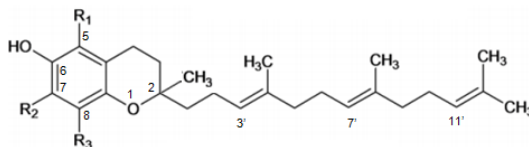


(a) Cromanol



(b)  $\alpha$ -Tocoferol



(c) *x*-Tocotrienol

| <b>R<sub>1</sub></b> | <b>R<sub>2</sub></b> | <b>R<sub>3</sub></b> | <b><i>x</i></b> |
|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| CH <sub>3</sub>      | CH <sub>3</sub>      | CH <sub>3</sub>      | $\alpha$        |
| CH <sub>3</sub>      | H                    | CH <sub>3</sub>      | $\beta$         |
| H                    | CH <sub>3</sub>      | CH <sub>3</sub>      | $\gamma$        |
| H                    | H                    | CH <sub>3</sub>      | $\delta$        |

**Figura 2:** Estrutura química dos componentes da vitamina E: (a) anel cromanol do tocoferol (b) tocoferóis e (c) tocotrienóis, bem como os grupos presentes em cada uma das formas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . (Prado 2008)

A vitamina E é exclusivamente sintetizada por plantas, sendo encontrada predominantemente em sementes. Óleos derivados de plantas e sementes representam uma das maiores fontes desta vitamina. Porém, a concentração de TC presente pode variar dependendo da planta da qual ele é extraído, sendo encontrado com maiores concentrações em óleo de girassol e azeite de oliva. O óleo de milho contém principalmente  $\gamma$ -tocoferol, e óleos derivados de soja contêm quantidades relativamente altas de  $\delta$ -tocoferol. Já os tocotrienóis são os principais componentes da vitamina E no óleo de palma, uma quantidade significativa destes é encontrado também em aveia e farelo de arroz. (Zingg 2007)

O TC é considerado o lipossolúvel mais abundante, de maior atividade biológica e o de maior atividade antioxidante dentre os oito componentes da vitamina E, sendo a ordem de reatividade dos quatro tocoferóis relatada como  $\alpha > \gamma > \beta > \delta$ . (Ching and Mohamed 2001; Byun, Hwang et al. 2011)

Apresentando-se na forma física como um óleo viscoso de cor amarela pálida, o TC é insolúvel em água, sendo solúvel em óleos, gorduras, e alguns solventes orgânicos, como a acetona, o éter etílico, o álcool etílico, o hexano e o clorofórmio. (Eitenmiller and Lee 2004)

Como antioxidante, o  $\alpha$ -tocoferol é capaz de capturar radicais livres (espécies reativas de oxigênio) e interromper reações de peroxidação lipídica, evitando a destruição dos lipídios (Sabliov, Fronczek et al. 2009). Sendo assim, afirma-se que o TC é um forte

reduzidor de efeitos do estresse oxidativo, auxiliando a prevenir o corpo humano de inúmeras doenças tais como câncer, doenças cardiovasculares, processo de envelhecimento, danos na membrana celular e DNA, oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, aterosclerose e distúrbios da pele, olhos, pulmões e outros constituintes do corpo ricos em lipídios. (Al-Malaika, Goodwin et al. 1999; Ching and Mohamed 2001)

Holownia et al. (2001) observaram a perda de tocoferol em óleo de amendoim usado para fritura de frango, já que durante o processo de fritura, o frango libera substâncias no óleo que agem como pró-oxidantes. Maiores perdas foram observadas para o  $\gamma$ -tocoferol, seguido de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\delta$ -tocoferol, porém, estas perdas reduziram significativamente quando foram adicionados filmes de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) no frango ou aos seus ingredientes de preparo. O grupo concluiu que o filme comestível apresenta-se como uma barreira hidrofílica para a migração de pró-oxidantes do alimento para o óleo evitando a redução dos teores de tocoferol presente. (Holownia, Erickson et al. 2001)

*Jongjareonrak et al. (2008)* estudaram as propriedades e a atividade antioxidante da pele de peixe, recobertas com filme de gelatina incorporadas com BHT ou TC. O grupo observou que o tempo de armazenamento e incorporação de BHT e TC afetaram as propriedades mecânicas e a coloração da pele do peixe recoberta com os filmes e diminuiu a permeabilidade a vapor de água destes. Os filmes contendo TC apresentaram-se mais transparentes e com um tempo de armazenamento maior. Por fim, eles observaram que a oxidação da gordura presente no peixe foi efetivamente retardada pela ação de ambos antioxidantes presentes no filme de gelatina. (Jongjareonrak, Benjakul et al. 2008)

A liberação de TC (pura e complexada com  $\beta$ -ciclodextrina) incorporada em diferentes formulações de filmes de polietileno de baixa densidade (PEBD) foi estudada por *Siró et al. (2006)*. A liberação do antioxidante foi realizada a partir de pequenas bolsas do material estudado preenchido com etanol 95% (como simulante de alimento gorduroso). A quantidade de TC que migrou para a solução foi determinada a partir da análise de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), onde o grupo observou a migração total do antioxidante tanto na forma pura quanto complexada, no entanto, o TC complexado com  $\beta$ -ciclodextrina apresentou um maior efeito na taxa de liberação do antioxidante. (Siro, Fenyvesi et al. 2006)

### 3.2 Sistemas Coloidais

Segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry-IUPAC (2002), o termo coloidal refere-se ao estado da subdivisão, ou seja, são partículas moleculares dispersas em um meio e apresentam pelo menos uma dimensão aproximadamente entre 1 nm a 1  $\mu$ m. Não é necessário para todas as três direções da partícula estar na faixa coloidal, ou seja, fibras em que apenas duas dimensões estão nesta faixa, e filmes finos, em que uma dimensão é neste intervalo, também podem ser classificados de como colóides. Assim, uma dispersão coloidal é um sistema onde as partículas de tamanho coloidal de qualquer natureza (sólido ou gás) estão dispersas em uma fase contínua de composição ou estado diferente. (Hunter 1993). Exemplos de dispersões coloidais são mostrados na Tabela 1.

Em um sistema coloidal, se todas as partículas dispersas são aproximadamente do mesmo tamanho, este sistema é considerado monodisperso, do contrario, quando existem grandes diferenças nos tamanhos das partículas o sistema é considerado polidisperso. (Hunter 1993)

**Tabela 1:** Exemplos de dispersões coloidais. (Araújo 2008).

| <b>Fase dispersa</b> | <b>Meio disperso</b> | <b>Nome técnico</b> |
|----------------------|----------------------|---------------------|
| Sólido               | Gás                  | Aerosol             |
| Líquido              | Gás                  | Aerosol             |
| Sólido               | Líquido              | Sol ou Sol coloidal |
| Líquido              | Líquido              | Emulsão             |
| Gás                  | Líquido              | Espuma              |
| Sólido               | Sólido               | Dispersão sólida    |
| Líquido              | Sólido               | Emulsão sólida      |
| Gás                  | Sólido               | Espuma sólida       |

### 3.3 Emulsões: Surfactantes

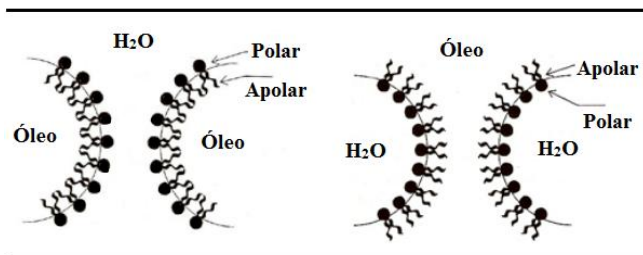
Emulsões são basicamente misturas de dois líquidos imiscíveis. Estas misturas consistem basicamente em formar pequenas gotículas de um dos líquidos (em menor quantidade), disperso no outro líquido (fase contínua) (Figura 3), existindo uma camada interfacial entre os dois líquidos ocupada por um material surfactante necessário. A formação desta solução deve ser estável, evitando a sedimentação e coalescência das gotículas. (Friberg, Larsson et al. 2004; Whitehurst 2004)

Existem três tipos de emulsão importantes na indústria de alimentos: (Friberg, Larsson et al. 2004)

- Óleo em água (o / w), onde gotículas de óleo são suspensas em uma fase aquosa contínua. Este tipo de emulsões são as mais versáteis existindo em diversas formas (maionese, licores, cremes, coberturas, sorvetes), e suas propriedades podem ser controladas variando os surfactantes usados e os componentes presentes na fase aquosa;

- Água em óleo (w / o), onde as gotículas de água estão suspensas em óleo ou gordura como fase contínua, como por exemplo, margarinas e manteiras. Estas dependem, para sua maior estabilidade das propriedades do surfactante e da gordura ou óleo usado do que nas propriedades da fase aquosa, e por isso, existem menos variáveis para controlar a sua estabilidade;

- O terceiro tipo são as emulsões múltiplas, (w / o / w ou o / w / o). Estas são as emulsões mais difíceis de produzir e controlar, porque as gotas de água contidas nas gotículas de óleo devem ser estáveis, como devem ser estáveis as gotas de óleo contido na fase contínua aquosa.



**Figura 3:** Tipos de emulsão: O/W e W/O.

Óleo e água são imiscíveis e não convivem confortavelmente devido à energia de superfície (energia livre de Gibbs) da interface óleo-água. Por causa da tensão interfacial entre o óleo e a água, qualquer emulsão procurará minimizar a energia interfacial, tornando a área interfacial entre o óleo e a água menor possível. Na ausência de surfactantes, a energia é minimizada pela coalescência das gotículas de óleo, formando camadas separadas de óleo e água. A presença de moléculas de surfactante adsorvido reduz a tensão interfacial entre as fases de óleo e água, de modo que a força motriz para a coalescência é reduzido, embora nunca alcance zero. (Friberg, Larsson et al. 2004)

Além de reduzir a tensão interfacial, muitos surfactantes inibem a coalescência, alterando as propriedades viscoelásticas da interface. O

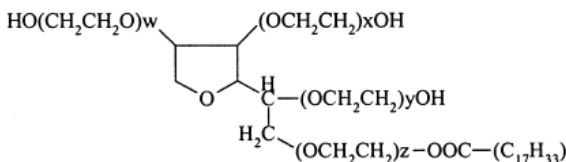
material adsorvido também pode prevenir a aproximação das gotículas de óleo, fazendo com que as superfícies possuam uma carga suficiente para repelir uma à outra. Assim, embora as emulsões tendam a ser consideradas termodinamicamente instáveis, é possível, pelo uso criterioso de surfactantes, controlar a cinética de desestabilização e produzir emulsões com vida útil muito longa. (Friberg, Larsson et al. 2004)

Surfactante é uma substância anfifílica, que possui em sua estrutura uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica. A parte lipofílica do surfactante tende a ligar-se com a parte apolar da solução, já a hidrofílica tende a ligar-se a parte polar. O equilíbrio entre estas duas fases é regulado pela funcionalidade do surfactante na interface. (Zhong and Li 2011)

Existem diversos artigos científicos que relatam a incorporação de surfactantes na formulação de filmes, para os mais diversos fins, como reduzir a tensão superficial da solução de formação do filme, e melhorar a capacidade de molhabilidade, propriedades mecânicas e aderência do filme, entre outros. Além disso, surfactantes são geralmente utilizados em alimentos contendo amido para retardar a retrogradação do amido, pois ele pode interagir com a amilose formando complexos indesejáveis. Assim, vários surfactantes têm sido usados para produzir filmes comestíveis e de revestimentos. (Zhong and Li 2011)

### 3.3.1 Polissorbato 80 ( Tween 80 –TW)

O Polissorbato 80, conhecido como tween 80 (TW) (polioxietileno sorbitano monooleato), é um importante surfactante hidrofílico, não iônico, que apresenta em sua estrutura um ácido graxo monoinsaturado (Figura 4). (Daher, Baroody et al. 2003; Taoka, Nagano et al. 2011)



$$w + x + y + z = 20$$

**Figura 4:** Estrutura molecular do TW.

Além do TW, existem outros tweens hidrofílicos, tais como o tween 20, 40 e 60, que se diferenciam por apresentarem em suas estruturas diferentes ácidos graxos, tais como o monolaureato, monopalmitato e o monoestearato, respectivamente. (Taoka, Nagano et al. 2011)

Os polissorbatos não apresentam uma forte interação com agentes ativos do material, o que tem tornado estes surfactantes indispensáveis na indústria de biotecnologia nas últimas duas décadas. Assim, os tweens têm sido amplamente utilizados para impedir, ou inibir, a adsorção de proteínas na superfície, e a agregação sob as diferentes condições de processamento, tais como mistura, congelamento, descongelamento, liofilização e reconstituição. Como resultado, diversos produtos contendo proteínas para fins farmacêuticos e alimentícios, tanto na forma líquida quanto sólida, apresentam em sua composição polissorbatos inativos como ingredientes. (Wang, Wang et al. 2008)

O TW tem sido amplamente utilizado nos mais diferentes ramos industriais. Isto se deve à alta eficácia deste surfactante em baixas concentrações (menos de 1% até 12%) e baixa toxicidade. Sendo principalmente utilizado como aditivo alimentício e em preparações farmacêuticas atuando como emulsificante, agente dispersante e estabilizante. Como emulsificante, o TW produz emulsões com boa estabilidade, fina textura e resistente à mudanças de pH. (Daher, Baroody et al. 2003)

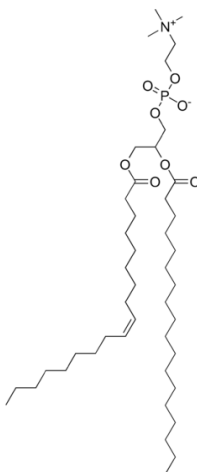
### **3.3.2 Lecitina**

A lecitina (Figura 5) foi descoberta em 1846 pelo químico francês Maurice Gobley, inicialmente isolada da gema do ovo. Muitos anos depois descobriu-se que o composto isolado não era uma estrutura química única e uniforme, mas sim, um grupo de componentes quimicamente semelhantes denominados fosfolipídios. (Whitehurst 2004).

Os fosfolipídios existem em todas as espécies vivas de plantas, animais e micro-organismos. A lecitina é uma mistura de fosfolipídios (Tabela 2) mais abundantes na natureza e está presente em praticamente todas as células vivas constituindo a membrana celular, onde atuam tanto na função estrutural quanto funcional interagindo com agentes metabólicos, íons, hormônios e anticorpos. Está presente em uma grande variedade de alimentos, tais como na gema do ovo, alguns tipos de chocolate e principalmente na soja (Whitehurst 2004).

**Tabela 2:** Composição química típica (%) da lecitina de soja (Araújo 2008).

| <b>Fosfolipídios</b>        | <b>%</b> |
|-----------------------------|----------|
| Fosfatidilcolina (lecitina) | 20,0     |
| Fosfatidiletanolamina       | 15,0     |
| Fosfatidilinositol          | 20,0     |
| Outros fosfatídios          | 5,0      |
| Carboidratos e esteróis     | 5,0      |
| Triglicerídios              | 35,0     |



**Figura 5:** Estrutura química da fosfatidilcolina, encontrada em maiores concentrações na lecitina de soja.

A solubilidade da lecitina em solventes orgânicos varia principalmente de acordo com o grupo polar e com a composição do ácido graxo na molécula. Com isso, boa parte dos fosfolipídios é solúvel em hexano e etanol, e insolúvel em acetona e água. (Whitehurst 2004)

A lecitina é utilizada comercialmente como agente emulsificante (surfactante) e está presente em sprays usados para evitar a adesão de alimentos em utensílios utilizados durante o cozimento. Além destes, numerosos suplementos dietéticos contendo lecitina de soja foram lançados no mercado nos últimos anos, isto se deve à função de suporte da lecitina evitando desperdícios na absorção nos nutrientes. (Pensabene, Fiddler et al. 1975; Campanella, Pacifici et al. 1998)

Misturas de lecitina e água são capazes de formar micelas cilíndricas em diversos solventes orgânicos. Considerando o fato de a

lecitina natural ser uma mistura de surfactantes de diferentes cadeias, pesos moleculares e graus de instauração, Cirkel et al. (1999) relatam o uso da lecitina de soja, de ovo e sintética, indicando que a fonte da lecitina é um fator importante para determinar a formação e estrutura cilíndrica da micela na emulsão. (Cirkel, Fontana et al. 1999).

Devido à sua hidrofobicidade compostos lipídicos têm sido muito usados como camadas de barreira de proteção para evitar trocas de umidade entre o alimento e o meio que o cerca, ou entre os demais componentes dentro do alimento. (The, Debeaufort et al. 2009)

Sabe-se que revestimentos de cera são utilizados em frutas frescas e vegetais para o controle do amadurecimento e dessecação. Por exemplo, The et al. (2009) compararam as propriedades de revestimentos sintéticos com revestimentos lipídicos quando utilizados em alimentos gordurosos. (The, Debeaufort et al. 2009)

O desempenho e eficiência dos filmes lipídicos em relação à transferência de massa residem também na sua integridade estrutural. Lipídios sólidos são geralmente frágeis e quebradiços dificultando a formação de camadas coesas. Assim, filmes comestíveis e de revestimento, necessitam de uma matriz de estrutura de apoio, como os polissacarídeos e proteínas, para obter melhores propriedades mecânicas. (The, Debeaufort et al. 2009)

Uma alternativa para a preparação de filmes contendo lipídios com melhores propriedades mecânicas seria a dispersão do lipídio em uma solução hidrocoloidal formando um filme a partir de uma emulsão. Neste caso, a eficiência da barreira depende não somente do tipo do lipídio como também da estrutura do filme emulsionado formado. Com isso, o processo de preparação e secagem do filme pode alterar a estrutura final do filme, tal como o tamanho e a distribuição das partículas do lipídio disperso. (The, Debeaufort et al. 2009)

### 3.4 Polímeros

Os polímeros apresentam ligações intermoleculares primárias fortes, pois dizem respeito às ligações dentro da mesma molécula, sendo normalmente essas ligações covalentes. Apresentam também ligações intermoleculares ou secundárias fracas entre as cadeias poliméricas, onde essas ligações aumentam com a presença de grupos polares e diminuem com o aumento da distância entre as moléculas podendo ser do tipo: ligação de hidrogênio ou força de Van der Waals. Em resumo, as ligações intramoleculares covalentes (fortes), através dos arranjos das unidades de repetição, determinam a estrutura química e o tipo de

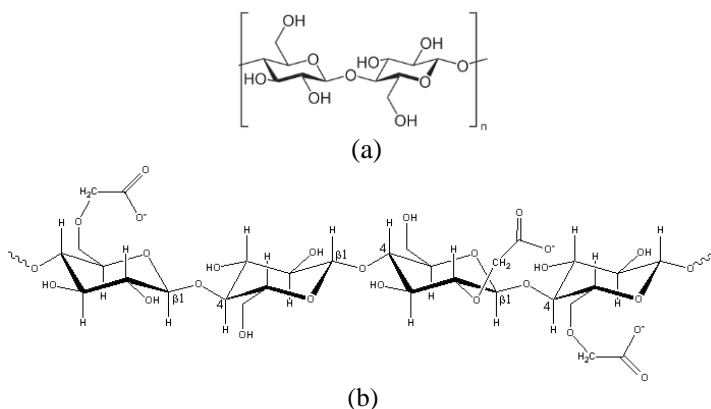


configuração, influenciando principalmente nas propriedades mecânicas e térmicas dos polímeros (como flexibilidade e rigidez) assim como na estabilidade térmica e química. Já as forças intermoleculares determinam a maioria das propriedades físicas dos polímeros, como a temperatura de fusão cristalina, transição vítrea, solubilidade, cristalinidade, difusão, deformação, entre outras. (Canevarolo 2002)

Por possuírem diferentes monômeros e massas moleculares os polímeros apresentam diferentes propriedades, podendo ser classificados com base em diversos aspectos, como por exemplo: sua ocorrência (natural ou sintética), sua forma molecular (linear, ramificado ou reticulado), seu arranjo espacial (isotático, sindiotático ou atático), comportamento mecânico (plástico, elastômero ou fibroso), processo de preparação (adição ou cadeia, copolímeros ou polímeros de condensação), de acordo com sua estrutura (termoplásticos ou termofixos), dentre outras classificações. (Lucas, Soares et al. 2001)

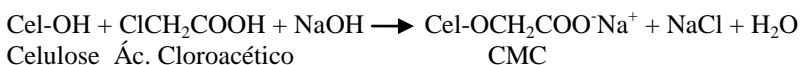
### 3.4.1 Carboximetilcelulose (CMC)

A celulose (Figura 6a) é um polímero natural de cadeia longa que apresenta em sua estrutura unidades de repetição do açúcar simples D-glicose, unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. A celulose é o polímero natural mais abundante na Terra e é o componente estrutural mais importante da parede das células vegetais, podendo ser modificada através de reações químicas formando diversos derivados. (Yasar, Togrul et al. 2007; Ibrahim, Adel et al. 2011)



**Figura 6:** Estrutura química do polissacarídeo (a) celulose e (b) carboximetilcelulose.

A CMC (Figura 6b), principal derivado da celulose, é um polieletrólito aniônico formado a partir da reação do ácido cloroacético ou do seu sal de sódio com a celulose alcalinizada (Figura 7), produzida via reação de Williamson (mecanismo SN<sub>2</sub>). A CMC é um copolímero biodegradável que apresenta duas unidades de repetição distribuídas regularmente ao longo da macromolécula: β-D-glicose e β-D-glucopiranosose 2-O-(carboximetil)-sal monossódico, unidas através de ligações β-1,4-glicosídicas. (Fujimoto, Reis et al. 2002; Yasar, Togrul et al. 2007)



**Figura 7:** Esquema da reação de formação da CMC.

Produzida inicialmente na Alemanha, a CMC é um importante produto industrial, mais comumente isolada e comercializada na forma de sal de sódio (CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>Na<sup>+</sup>). Apresenta como vantagem a presença de grupos carboxilatos que lhe confere solubilidade em água quando o grau médio de substituição é maior que 0,5 e pode ser obtida a partir de biomassa abundante e barata, como o bagaço da cana-de-açúcar proveniente de usinas de açúcar e álcool (Fujimoto, Reis et al. 2002). As propriedades atribuídas à CMC dependem de três fatores: massa molecular do polímero, número médio de conteúdo carboxila por unidade de anidroglicose, e a distribuição do substituinte carboxila ao longo das cadeias do polímero. Entre todos os polissacarídeos, a CMC é facilmente encontrada e possui um baixo valor no mercado (Biswal and Singh 2004).

A CMC vem sendo utilizada nos mais diversos setores industriais, o que inclui as indústrias alimentícias, de fabricação de papel, de tintas, farmacêutica, cosmética e de processamento mineral. Como exemplos de usos na indústria podem ser citados o uso da CMC como espessante, como agente de retenção de água, como floculador, como estabilizante de dispersões, além de auxiliar a extrusão e a moldagem de filmes e de melhorar a consistência e as propriedades de fluxo (Biswal and Singh 2004; Ueno, Yokota et al. 2007; Yasar, Togrul et al. 2007; Li, Sun et al. 2009). De acordo com o *Food and Drugs Administration* (FDA), a CMC é listada como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) na utilização para embalagens de alimentos, ou seja, não há nenhuma evidência nas informações disponíveis sobre a CMC que demonstre ou sugira motivos razoáveis para suspeitar de algum tipo de

perigo para o público quando é usada em embalagens. Assim, por não apresentar efeitos nocivos à saúde humana, a CMC é utilizada como aditivo altamente eficaz para melhorar a qualidade do produto e as propriedades de processamento em vários campos de aplicação, principalmente em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, bem como na produção de papel e têxtil. (Ghanbarzadeh, Almasi et al. 2011)

A CMC possui um grande papel no setor alimentício, sendo utilizada na produção de achocolatados em pó, recheios, coberturas, misturas para bolos, bebidas lácteas, produtos cárneos, pães e sorvetes. Em pães, a CMC vem sendo usada como um substituinte de glúten para celíacos, e fornece uma estrutura mais esponjosa influenciando na cinética de endurecimento do pão. Já em sorvetes, bebidas lácteas e leite, inibe a formação de cristais, estabiliza e homogeneiza emulsões água/gordura. Além disso, o uso de filmes de CMC como um invólucro flexível para o recobrimento de alimentos gordurosos, bem como armazenamento na forma de embalagens, vem sendo estudados. (Hollabaugh, Burt et al. 1945; Corsetti, Gobbetti et al. 2000; Gujral, Guardiola et al. 2003)

Muitas pesquisas têm sido feitas visando avaliar a aplicabilidade de filmes de CMC. *Sayanjali et al. (2011)* estudaram os efeitos antimicrobianos de filmes comestíveis de CMC contendo sorbato de potássio, utilizado como um agente antimicrobiano, no recobrimento de pistaches frescos. Os resultados obtidos pelo grupo mostraram que o filme de CMC com e sem o antimicrobiano inibiram o crescimento do fungo *Aspergillus*. Com isso a CMC mostrou-se promissora uso de filmes comestíveis e revestimentos a fim de manter a qualidade dos alimentos. (Sayanjali, Ghanbarzadeh et al. 2011)

As propriedades mecânicas e a permeabilidade a vapor de água (PVA) de filmes de CMC incorporados com glicerol e ácido oleico foram avaliadas *Ghanbarzadeh et al. (2011)*. Assim, o aumento da concentração de glicerol nos filmes diminuiu a resistência mecânica e aumentou a PVA. O ácido oléico reduz a PVA dos filmes de CMC, porém sua adição desfavorece as propriedades mecânicas do filme, que apresentam valores menores em relação aos filmes incorporados com glicerol. Portanto, uma proporção adequada de glicerol e de ácido oleico é necessária para reduzir a permeabilidade ao vapor de água através dos filmes de CMC, embora não apresente qualquer efeito desfavorável sobre as propriedades mecânicas. (Ghanbarzadeh and Almasi 2011)



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

O polímero CMC (MW 250 000 e grau de substituição DS= 0,9) e o  $\alpha$ -tocoferol (TC) foram obtidos da Sigma-Aldrich, o polissorbato 80 (Tween 80-TW) foi obtido da Vetec e a lecitina de soja (L) (75% de fosfatidilcolina), Lipoid S75-3 (SPC) foi obtida da Lipoid. O radical ABTS [2,2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), bem como o antioxidante Trolox foram obtidos da Sigma-Aldrich.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Obtenção dos filmes CMC por emulsão

Os filmes de CMC foram obtidos pela técnica de *casting*. Para cada filme, 2 g de CMC foram solubilizadas em 100 ml de água destilada por 24 h a 60 °C e 250 rpm, para promover a completa solubilização da CMC. Após esta etapa, as emulsões contendo CMC, TC e os surfactantes foram homogeneizadas em um Ultra-Turrax (Modelo T25; IKA-Works, Inc, Cincinnati) a 7500 rpm por 20 min. Para as emulsões contendo lecitina, a mesma foi previamente dissolvida em 5 ml de etanol e depois adicionada aos demais componentes da formulação e homogeneizada no Ultra-Turrax. O próximo passo foi a remoção das bolhas da emulsão filmogênica, o que foi feito utilizando um ultrassom por 60 minutos a temperatura ambiente. A solução foi despejada em placa de Petry e a etapa de secagem foi realizada em capela à temperatura ambiente durante um período de 4 a 6 dias. Após a secagem, os filmes foram removidos das placas de Petri e estocados para as análises posteriores. Durante todas as etapas, a emulsão e os filmes foram protegidos da luz através da utilização de papel alumínio. As formulações e os códigos das amostras estão demonstrados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Composição em massa dos filmes de CMC com TW e Lecitina de soja.

| Filmes | CMC<br>(g) | $\alpha$ -Tocoferol (TC)<br>(mg/g CMC) | Tween 80 (TW)<br>(mg/g CMC) | Lecitina<br>(mg/mg TC) |
|--------|------------|--|-----------------------------|------------------------|
| A      | 1          | --                                     | --                          | --                     |
| B      | 1          | 50                                     | --                          | --                     |
| C      | 1          | --                                     | 10                          | --                     |
| D      | 1          | --                                     | 20                          | --                     |
| E      | 1          | 50                                     | 10                          | --                     |
| F      | 1          | 50                                     | 20                          | --                     |
| G      | 1          | 50                                     | 30                          | --                     |
| H      | 1          | 50                                     | 50                          | --                     |
| I      | 1          | 50                                     | 70                          | --                     |
| J      | 1          | 50                                     | 50                          | 0,25                   |
| K      | 1          | 50                                     | 50                          | 0,50                   |
| L      | 1          | 50                                     | 50                          | 0,75                   |
| M      | 1          | 50                                     | 50                          | 1                      |
| N      | 1          | 50                                     | --                          | 1                      |
| O      | 1          | --                                     | 20                          | 1                      |
| P      | 1          | --                                     | --                          | 1                      |

#### 4.2.2 Avaliação da estabilidade do $\alpha$ -tocoferol na matriz polimérica

A estabilidade do antioxidante TC nos filmes de CMC foi avaliada a partir da espectroscopia no infravermelho e fluorescência, cujas metodologias são apresentadas a seguir.

##### 4.2.2.1 Análise de fluorescência

Para estudar a degradação do TC incorporados nos filmes de CMC incorporados foram feitos espectros de fluorescência durante 8 semanas, em um espectrofluorímetro Hitachi F-4500. As fendas de excitação e emissão do monocromador foram ajustadas para 2,5 nm. As amostras foram excitadas em 290 nm e os espectros de emissão foram obtidos de 300 a 450 nm apresentando uma emissão máxima em 325 nm. Os filmes foram recortados em tamanhos retangulares de 2,0 x 3,5 cm, para que encaixassem perfeitamente no porta amostra.

#### 4.2.2.2 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais e seus possíveis deslocamentos nos filmes de CMC foram avaliados usando um espectrômetro IR Prestige (Shimadzu). A faixa de comprimentos de onda usada foi de  $700$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.3 Caracterização dos filmes

Os filmes de CMC produzidos foram caracterizados quanto às suas propriedades: físico-químicas, de barreira, mecânicas, estruturais e térmicas, cujas metodologias de análise são apresentadas a seguir.

##### 4.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia da superfície das amostras e das fraturas criogênicas foi avaliada com um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV. As amostras foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro antes da obtenção das micrografias. A voltagem utilizada foi de  $10$  a  $15\text{ kV}$ .

##### 4.2.3.2 Análise mecânica

A espessura dos filmes (aproximadamente  $100$ - $150\text{ }\mu\text{m}$ ) foi determinada em quatro pontos ao longo de cada amostra com um micrômetro Marathon ( $\pm 1\text{ }\mu\text{m}$ ). Os testes de tensão foram realizados até a ruptura das amostras. A velocidade utilizada durante os experimentos foi de  $1\text{ mm.min}^{-1}$  com uma separação inicial das garras de  $50\text{ mm}$ . As propriedades mecânicas foram determinadas utilizando uma máquina Emic DL2000, com uma célula de carga de  $500\text{ N}$ . Os testes foram baseados na norma ASTM D882-02, com algumas modificações. Foram utilizadas no mínimo  $10$  amostras para cada formulação ( $10\times 100\text{ mm}$ ). As amostras foram previamente equilibradas a uma umidade relativa de  $58\%$  utilizando solução saturada de NaBr.

##### 4.2.3.3 Permeabilidade ao vapor d'água (PVA)

A permeabilidade ao vapor d'água foi determinada gravimetricamente a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizando-se o método padrão E-96 da ASTM (ASTM, 1980) com algumas modificações. Os filmes (discos com área  $0,0019\text{ m}^2$ ) foram selados em células de permeação contendo

sílica (2% UR). As células de permeação foram então acondicionadas em um dessecador contendo cloreto de sódio (75% UR). O vapor de água transferido através do filme foi determinado pelo aumento de massa da sílica, medido a cada hora por 10 h. Os testes foram realizados em triplicata. A PVA foi calculada de acordo com a equação (1). (Sarantópoulos, Oliveira et al. 2002):

$$PVA = \frac{m/t \cdot e}{A \cdot p_s \cdot \left( \frac{UR_1 - UR_2}{100} \right)} \quad (1)$$

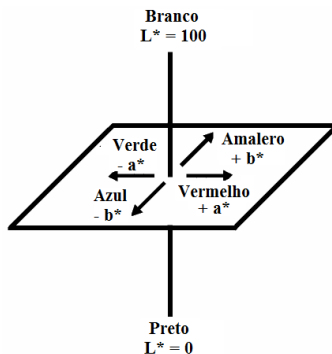
**Onde:**  $e$  é a espessura média de cada filme (m);  $A$  é a área de permeação ( $0,0019 \text{ m}^2$ );  $UR_1$  é a umidade relativa no interior da cuba (75 %);  $UR_2$  é a umidade relativa no interior das células (2 %);  $p_s$  é a pressão de saturação do vapor a temperatura do ensaio (kPa); e o termo  $m/t$  (g água/dia) foi calculado a partir da regressão linear obtida pelo ganho de massa em função do tempo.

#### 4.2.3.4 Análise Colorimétrica

O efeito da adição do TC e dos surfactantes na coloração dos filmes de CMC foi avaliado utilizando o sistema CIELAB, através de um colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japão). Os filmes foram colocados em uma superfície virada para baixo em direção ao feixe de leitura do equipamento. Para cada amostra foram realizadas cinco leituras, distribuídas na área do filme.

Este sistema CIELAB (Comission Internationale de Eclairage) permite definir os parâmetros  $L^*$ , que caracteriza a luminosidade, variando do branco ( $L=100$ ) ao preto ( $L=0$ ), o  $a^*$ , que indica a intensidade do verde ( $-a^*$ ) ao vermelho ( $+a^*$ ) e o  $b^*$  que fornece a intensidade do azul ( $-b^*$ ) ao amarelo ( $+b^*$ ) (Figura 8).





**Figura 8:** Esquema de cores do método CIELAB.

A diferença total de cor ( $\Delta E^*$ ) também foi calculada. Este parâmetro leva em conta as diferenças entre  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  na amostra calculada através da equação (2).

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

#### 4.2.3.5 Testes de liberação do $\alpha$ -tocoferol dos filmes de CMC

Os testes de liberação do TC foram realizados *in vitro*, segundo Wessling et al. (Wessling, Nielsen et al. 1999), com algumas modificações. No estudo, etanol absoluto foi utilizado como meio de liberação simulante de alimentos com alto teor de gordura. Para cada amostra, aproximadamente 450 mg de filme foram pesadas e completamente imersos em 30 mL de etanol absoluto P.A. em frascos âmbar de 60 mL. As amostras devidamente fechadas foram então estocadas protegidas de luz e a temperatura ambiente. As amostras foram analisadas durante um período de 8 semanas, sendo que na primeira semana as leituras ocorreram diariamente, enquanto que nas semanas posteriores a análise foi realizada semanalmente. Para cada filme analisado preparou-se 16 frascos com a amostra, todas as medidas realizadas em triplicata (totalizando 42 frascos), um para cada dia de medida (de 1 a 7 dias) e um para cada semana restante de análise (7 frascos), ou seja cada análise foi única e ao término de cada semana o conteúdo dos frascos era descartado.

A quantificação dos níveis de TC foi analisada por espectroscopia na região do UV em espectrômetro Nova 1800 UV (Nova Instruments), na região de 292 nm. O método foi validado

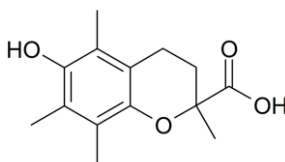
utilizando os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) para garantir que o método analítico gerasse informações confiáveis e interpretáveis sobre as amostras. A curva analítica foi linear no intervalo de 15-300  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  com um coeficiente de correlação de 0,9902. A equação de regressão da média de calibração do gráfico ( $n = 3$ ) foi  $y = 6.9012x - 0,0271$ . O LOD e LOQ calculado foram 0,0062  $\text{mg mL}^{-1}$  e 0,0189  $\text{mg mL}^{-1}$  respectivamente.

A porcentagem de liberação foi calculada em relação a quantidade total de TC adicionado na formulação dos filmes, ou seja em relação ao teor teórico de 100% equivalente a 50  $\text{mg/g}$  CMC.

#### 4.2.3.6 Atividade antioxidante do $\alpha$ -tocoferol (DPPH e ABTS)

A atividade antioxidante (DPPH e ABTS) são métodos colorimétricos que monitoram o decaimento na absorvância do radical pela oxidação com a adição de uma amostra contendo antioxidante.

A quantidade de ABTS e DPPH consumida é relacionada à reação com o TC da amostra e os resultados são expressos capacidade antioxidante equivalente em Trolox (TEAC), que é um antioxidante sintético muito eficiente com estrutura molecular parecida com o TC (Figura 9).



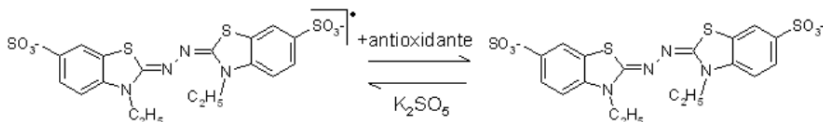
**Figura 9:** Estrutura molecular do antioxidante sintético Trolox.

**Método ABTS:** o método ABTS (estrutura do radical mostrada na Figura 10) foi realizado de acordo com (Re, Pellegrini et al. 1999) com algumas modificações. Após o preparo do radical ABTS (7 mmol/L - 0,03836g de ABTS dissolvido em 10 mL de água deionizada), preparou-se uma solução de persulfato de potássio (2,45 mmol/L - 10 mL de ABTS e 10 mL de persulfato misturados, homogeneizados e mantidos num frasco âmbar pelo mínimo 16 horas protegido da luz). Para o ensaio da amostra, foi pipetada uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do radical formado e diluído em aproximadamente 10 mL de etanol 99° P.A. Medidas de absorbância a 734 nm, foram realizadas para certificação da densidade óptica em torno de  $0,700 \pm 0,05$  através de um espectrômetro na região do UV (Hitachi UV spectrophotometer, U-

1800). Uma alíquota de 980  $\mu\text{L}$  do radical diluído foi pipetada e transferida para uma cubeta de 10 mm (1 mL) procedendo a medida da absorbância ( $A_{754}=A_o$ ), adicionando imediatamente 20  $\mu\text{L}$  da amostra seguido de homogeneização e agitação por alguns segundos. Passados 7 minutos, outra medida de absorbância ( $A_{754}=A_f$ ) foi realizada. Trolox foi utilizado como padrão (15  $\mu\text{mol/L}$  = 0,13209g/500 mL). O cálculo da porcentagem de inibição do radical foi realizado a partir da seguinte fórmula (3):

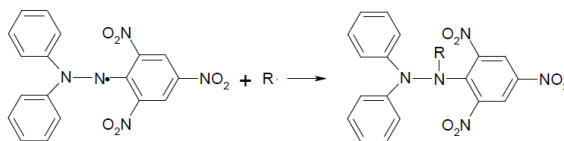
$$\% \text{ de inibição do radical} = (1 - A_f/A_o) \times 100 \quad (3)$$

onde, “ $A_o$ ” é a absorbância inicial e “ $A_f$ ” é a absorbância final. Os cálculos foram realizados para cada concentração de amostras analisadas de forma que ao obter os resultados se pôde realizar uma curva dose-resposta. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol TEAC/g}$  (capacidade antioxidante equivalente em Trolox).



**Figura 10:** Estrutura molecular do ABTS e reação de estabilização.

**Método DPPH:** o método DPPH (estrutura do radical mostrada na Figura 11) foi realizado de acordo com (Kim, Lee et al. 2002), com algumas modificações. Depois de preparar o radical (0,1 mmol/L - 0,03943 g de DPPH dissolvidos em 10 mL de etanol a 80%), procede-se a medida da absorbância inicial ( $A_{515}=A_o$ ). Em seguida, uma alíquota de 2,9 mL da solução de DPPH foi misturado com 0,1 mL da amostra. As amostras foram mantidas em um lugar escuro, e após 30 minutos mediu-se a absorbância final ( $A_{515}=A_o$ ) a 515 nm. O antioxidante Trolox foi usado como padrão (150 mg / L). A porcentagem de inibição radical foi calculado pela mesma fórmula descrita para o ensaio ABTS. Resultados foram expressos em mg TE (Trolox equivalente) / g.



**Figura 11:** Estrutura molecular do DPPH e reação de estabilização.

As análises de atividade antioxidante foram realizadas com as mesmas amostras da análise de liberação de TC e seguindo o mesmo período de 8 semanas, sendo que na primeira semana as leituras ocorreram diariamente, enquanto que nas semanas posteriores a análise foi realizada semanalmente. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e no mesmo dia das análises de liberação.

#### 4.2.3.7 Análise estatística

O programa Statistica® 7.0 (Stasoft, USA) foi utilizado para calcular as análises de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi usado para determinar diferenças entre as propriedades dos filmes no intervalo de 95% de confiança.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

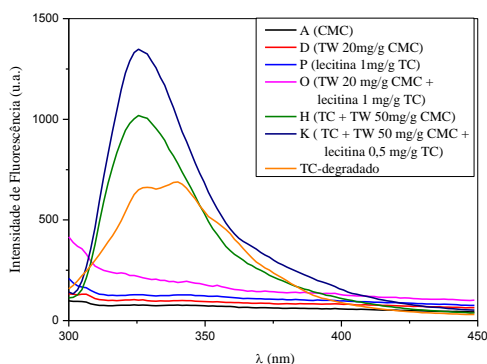
### 5.1 Incorporação do antioxidante $\alpha$ -tocoferol na matriz polimérica de CMC por emulsão

Como primeira estratégia de incorporação de TC em filmes de CMC, utilizou-se a técnica de filmes por microemulsão. Primeiramente foram feitos filmes com o surfactante de fase hidrofílica o TW (HLB = 15), aprovado pelo FDA. De acordo com os resultados experimentais, TW demonstrou ter capacidade de estabilizar a emulsão filmogênica. Então, em uma segunda etapa, utilizou-se o TW como surfactante para fase aquosa e a lecitina de soja como surfactante da fase oleosa.

### 5.2 Avaliação da estabilidade do $\alpha$ -tocoferol na matriz polimérica

#### 5.2.1 Análise de fluorescência

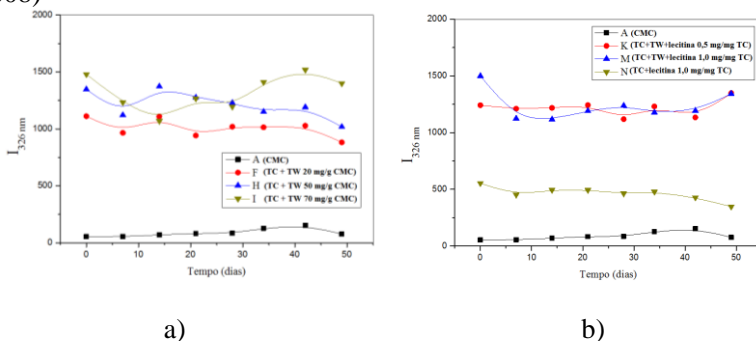
- Através de medidas de fluorescência do TC foi possível acompanhar durante um período de 8 semanas a estabilidade do antioxidante nos filmes de A, D, F, H, I, K, M, N, O e P. A Figura 12 mostra o espectro de fluorescência no tempo máximo de análise (8 semanas) dos filmes estudados e de uma solução de TC degradado, este último, para mostrar a mudança na curva de fluorescência após degradação. Os espectros dos filmes A, D, O e P não apresentaram emissão de fluorescência na região do TC quando excitado em 290 nm (Figura 12), indicando que a CMC, a lecitina e o TW por não apresentarem bandas de fluorescência não influenciaram na intensidade de fluorescência do TC incorporado na matriz polimérica.



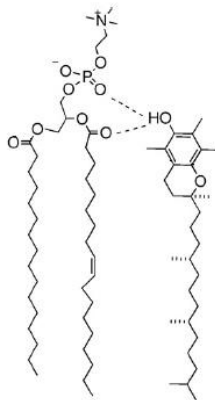
**Figura 12:** Espectro de emissão de fluorescência dos filmes A, D, P, O, H, K, TC-degradado.

Nas 8 semanas estudadas, os espectros dos filmes A, D, F, H, I, K, M, N, O e P apresentaram o mesmo comportamento. Os filmes contendo o TC incorporado não apresentaram mudanças nas curvas de fluorescência ao qual demonstrassem semelhança com a curva do antioxidante oxidado, sugerindo que o TC não degradou no período estudado, quando incorporado na matriz.

A partir dos espectros de fluorescência dos filmes contendo o antioxidante e CMC (A, F, H, I, K, M e N), construiu-se um gráfico da emissão máxima em 326 nm *versus* tempo (Figura 12), a fim de acompanhar a estabilidade do TC nos filmes. A Figura 13a apresenta os filmes preparados a partir da emulsão com o surfactante TW, os quais mostraram boa estabilidade durante o período estudado. Nos filmes preparados com TW e TC, mostraram mesma faixa de intensidade de fluorescência, mesmo na presença de lecitina (Figura 13b), indicando que o TW, que apresenta o mesmo caráter hidrofílico da matriz, tem um importante papel na dispersão do TC. Com a ausência do TW, o filme N que tem em sua formulação somente a lecitina de caráter hidrofóbico, apresentou intensidade de fluorescência mais baixa, quando comparado aos outros filmes com TW, no entanto, mostrou boa estabilidade. Este comportamento pode ter ocorrido devido à lecitina e o TC presente apresentarem interação por ligações de hidrogênio entre os grupos fosfato da lecitina e as hidroxilas presentes na estrutura do anel cromanol (Figura 2) do TC como ilustrado na Figura 14 (Atkinson, Epand et al. 2008). Conforme descrito na literatura, a possível formação de vesículas de lecitina leva a incorporação do TC, diminuindo a intensidade de fluorescência do antioxidante. (Atkinson, Epand et al. 2008)



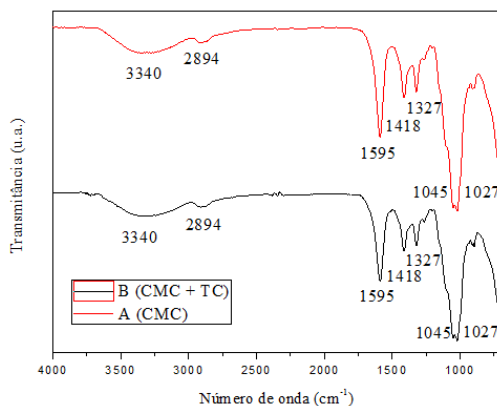
**Figura 13:** Gráfico de intensidade máxima fixada em 326 nm *versus* tempo de análise para os filmes: a) A, F, H e I; b) A, K, M e N.



**Figura 14:** Esquema da interação por ligações de hidrogênio entre a molécula de fosfatidilcolina da lecitina com o TC (Atkinson, Epanand et al. 2008).

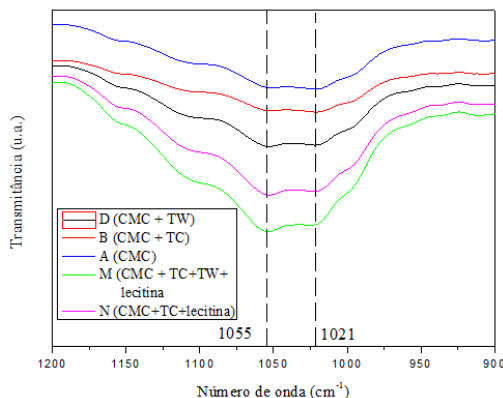
### 5.2.2 Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

A Figura 15 mostra os espectros no infravermelho dos filmes de CMC pura (A) e CMC/TC (B) obtidos para observar possíveis alterações das bandas de absorção do polímero com a adição do TC e surfactantes. Para a CMC foi possível observar as principais bandas de absorção características em  $3340\text{ cm}^{-1}$  referentes às ligações O-H (hidroxilas),  $2894\text{ cm}^{-1}$  das ligações vibracionais C-H,  $1595\text{ cm}^{-1}$  das ligações C=O do ânion  $\text{COO}^-$ ,  $1418\text{ cm}^{-1}$  de ligações  $\text{CH}_2$ ,  $1327\text{ cm}^{-1}$  das ligações OH e em  $1045\text{ cm}^{-1}$  de ligações simples C-O da cadeia cíclica (Biswal and Singh 2004). O espectro do filme B, que apresenta CMC e TC em sua composição, é possível observar que a presença do TC não afetou a estrutura do polímero, uma vez que o TC hidrofóbico não apresenta interação significativa com a matriz hidrofílica (são imiscíveis) não ocorrendo assim, alteração nas bandas características da CMC.



**Figura 15:** Espectros no infravermelho dos filmes A e B.

Na Figura 16 é mostrado o espectro na região do infravermelho dos filmes A, B, D, M e N entre 1200 e 900  $\text{cm}^{-1}$ . Nesta região é observada a banda em 1045  $\text{cm}^{-1}$  referente às ligações C-O, onde é possível observar que para os filmes contendo TW e lecitina (D, M e N) a intensidade da banda em 1045  $\text{cm}^{-1}$  é maior que a observada em 1021  $\text{cm}^{-1}$ , comprovando a presença dos surfactantes na matriz polimérica. É importante destacar que esta mesma banda de absorção é observada para o TW devido à ligação C-O cíclica, e na lecitina pelas absorções referente aos grupos P-O-C e  $\text{PO}_2^-$  da fosfatidilcolina (Kuligowski, Quintas et al. 2008). O mesmo fato não é evidenciado para o filme B contendo apenas TC na matriz.



**Figura 16:** Espectros no infravermelho dos filmes A, B, D, M e N no comprimento de onda entre 900 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ .

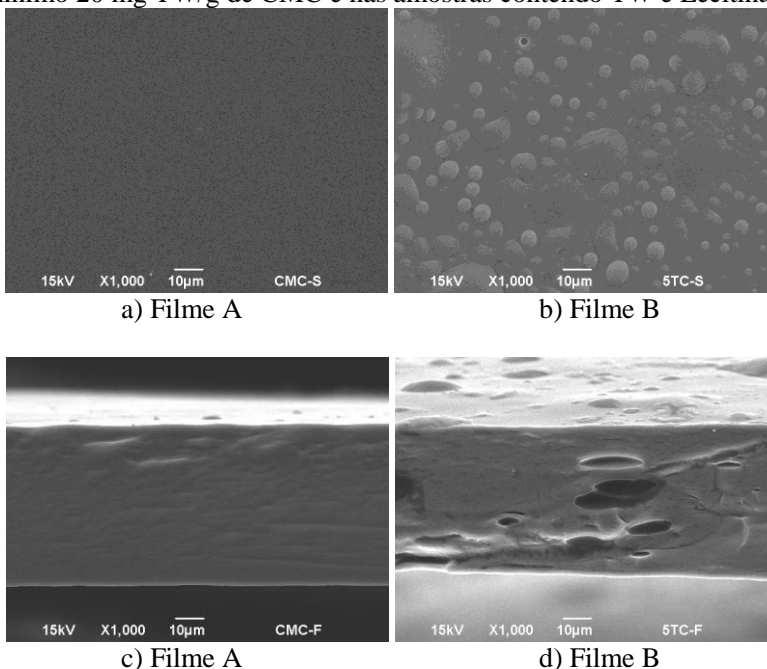


### 5.3 Caracterização dos filmes

#### 5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

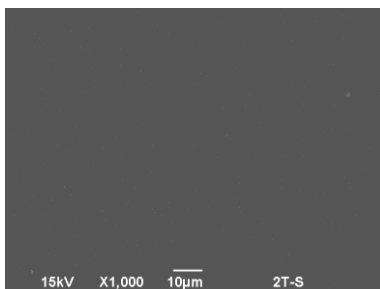
A formulação dos filmes poliméricos, bem como o processo de obtenção são os principais fatores que alteram a morfologia do material e também as suas propriedades. As micrografias da fratura e superfície dos filmes analisados estão apresentadas nas Figuras 17 - 21.

A homogeneidade dos filmes foi analisada e observou-se (Figura 17) que o filme A (CMC pura), apresenta-se homogêneo, enquanto que o filme B, contendo TC sem os surfactantes, apresenta cavidades em sua estrutura que podem ser relacionadas com separação de fase, uma vez que a CMC e o TC são imiscíveis. Esta separação de fase já havia sido evidenciada durante o processo de secagem dos filmes, com as partículas de TC aglomerando-se e migrando para a superfície da matriz. Fato que não ocorreu com as amostras contendo no mínimo 20 mg TW/g de CMC e nas amostras contendo TW e Lecitina.

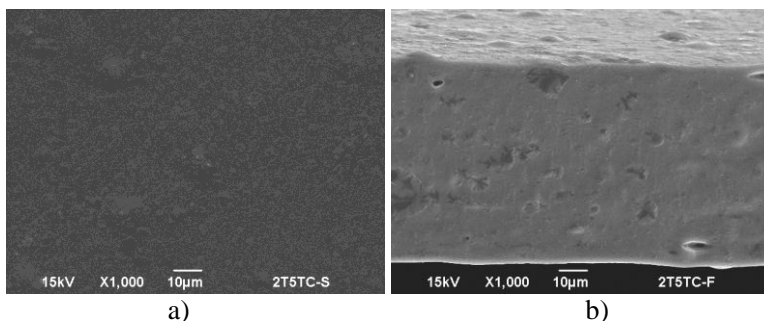


**Figura 17:** a) e b) Superfície, c) e d) Fratura dos filmes A (CMC pura) e B (CMC e TC) com aumento de 1000x.

O filme contendo somente TW, amostra D, (Figura 18) apresentou uma superfície homogênea. Nas Figuras 19 a 21 são mostradas as micrografias das fraturas criogênicas dos filmes F, H, I, K, L, M e N, de CMC com o TC e os surfactantes.

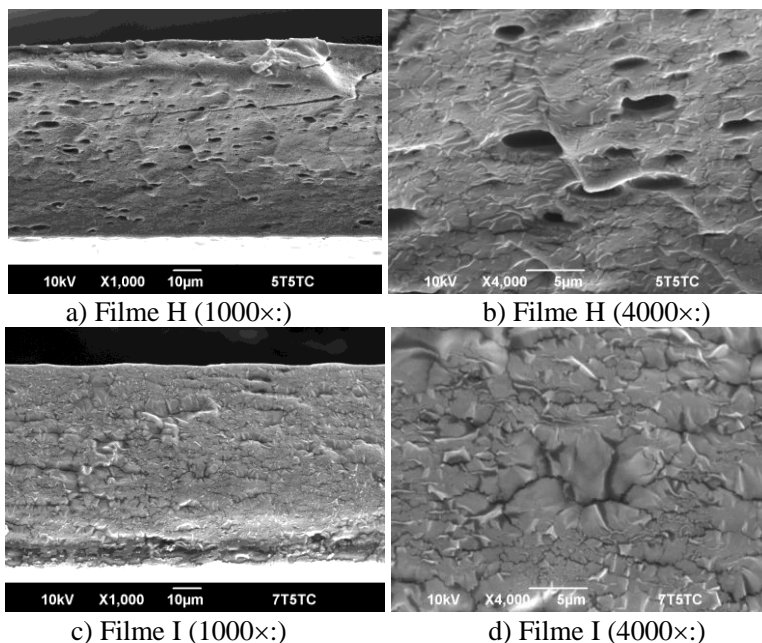


**Figura 18:** Superfície do filme D (1000×).



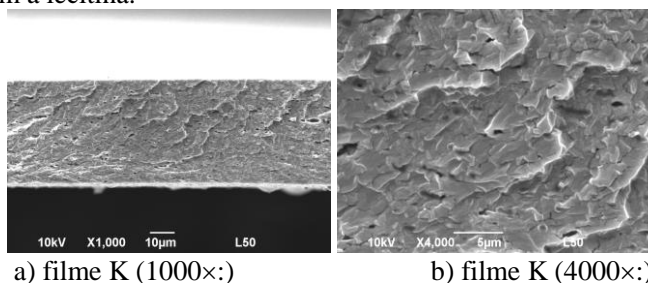
**Figura 19:** a) Superfície e b) Fratura criogênica do filme F (1000×).

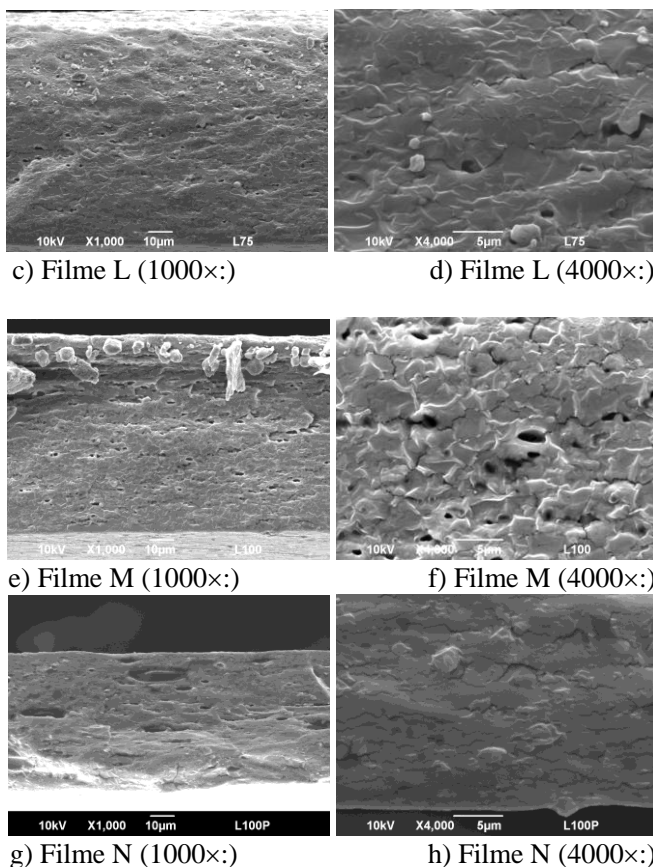
A Figura 19 e 20 apresentam a microscopia da fratura criogênica dos filmes F, H e I, contendo na matriz TW e TC, observando-se que estes filmes apresentam boa dispersão e sem separação de fase, porém é possível observar nos filmes H e I cavidades na estrutura dos filmes que podem levar a uma alteração nas propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água do material.



**Figura 20:** Fratura criogênica dos filmes de CMC com TC e TW: H e I.

A Figura 21 apresenta as microscopias das fraturas criogênicas dos filmes de CMC com TC, lecitina e TW (filmes K, L, M e N), sendo possível observar uma boa dispersão e homogeneidade, uma vez que os filmes não apresentam separação de fase do TC, como também é possível observar a presença de cavidades, porém, de dimensões muito menores. O fato das cavidades serem menores não elimina a possibilidade de ocorrer alterações das propriedades mecânicas e na permeabilidade ao vapor de água nos filmes, entretanto estas alterações podem ser menos significativas para estes sistemas que nos filmes com TW sem a lecitina.





**Figura 21:** Fratura criogênica dos filmes de CMC com TC, lecitina e TW: K, L, M e N.

### 5.3.2 Propriedades mecânicas e permeabilidade ao vapor de água (PVA)

Filmes a base de polissacarídeos apresentam boas propriedades de barreira a gases e possuem a habilidade de se aderir a superfície de frutas ou vegetais. No entanto, são hidrofílicos por natureza e consequentemente apresentam baixas propriedades de barreira a umidade. Uma maneira de melhorar as propriedades de barreira de

filmes a base de polissacarídeos é adicionar aos filmes, compostos de caráter hidrofóbico (Diaz-Sobac, Garcia et al. 2002).

Os dados da permeação ao vapor de água (PVA) e as propriedades mecânicas dos filmes são mostrados na Tabela 4. Em relação à PVA observou-se que para filme B, contendo somente TC, a permeabilidade ao vapor de água aumentou em aproximadamente 100 % em relação ao filme A contendo apenas CMC, fato este contrário ao que se esperaria quando da adição de uma substância oleosa em uma matriz hidrofílica na ausência de separação de fases. Conforme observado na micrografia de MEV (Figura 17b) ocorreu separação de fases sendo que o TC apresentou uma tendência de sair da matriz polimérica durante o processo de secagem, facilitando a formação de cavidades no filme (ver fratura criogênica, Figura 17d), aumentando dessa forma a PVA comparativamente a CMC pura. A mesma tendência de aumento de PVA dos filmes foi observada com adição de TW à matriz polimérica, independente da presença ou não de TC. A presença de TW na matriz polimérica exerceu um efeito plastificante significativo quando a quantidade adicionada foi maior que 20 mg/g(CMC). Este efeito resultou em um decréscimo do módulo de Young e no aumento do alongamento máximo dos filmes (Tabela 4). É conhecido que o efeito plastificante aumenta o volume livre de sistemas poliméricos favorecendo dessa forma diferentes processos de permeação incluindo a PVA. Debeaufort e Voilley (Debeaufort and Voilley 1995) avaliaram a PVA e as propriedades mecânicas de filmes de metilcelulose, concluindo que estas foram afetadas pelo tamanho da partícula, o tipo e a concentração de surfactante e o processo de secagem. Pode-se presumir então que nos filmes de CMC obtidos por emulsão, os surfactantes auxiliam na dispersão do TC, evitando a formação de grandes cavidades que geralmente causam um aumento na PVA. Por outro lado, o efeito plastificante dos mesmos, causa um aumento do volume livre das cadeias poliméricas, facilitando a passagem da água através do filme.

Contrariamente, a presença de lecitina juntamente com o TW (filmes J, K, L e M), reduziu a PVA a valores próximos ao da CMC pura (filme A). Este comportamento deve-se ao efeito da lecitina na redução do tamanho das micelas de TC formadas, reduzindo a separação de fase, anulando ou reduzindo dessa forma o efeito plastificante do TW. Este comportamento pode ser explicado através da interação da lecitina com o TW, aumentando a estabilidade do filme. Estudos demonstraram que a lecitina auxilia na estabilização de misturas de lipídeo-surfactante em sistemas de liberação de medicamentos (Simões, Tapadas et al. 2005).

Neste caso, a estabilização do sistema na presença de lecitina pode ser confirmada pelas características morfológicas tanto da superfície como da fratura criogênica das matrizes poliméricas estudadas (Figura 21), as quais apresentaram-se mais homogêneas e sem a presença de grandes vazios como nos sistemas F, H e I (Figuras 19 e 20).

A análise estatística de Tukey ( $p < 0,05$ ) para os dados da PVA dos filmes sugerem que os filmes contendo lecitina e TW (filmes J, K, L e M), em função da maior homogeneidade e maior interação entre os surfactantes, TC e matriz polimérica, apresentaram valores de PVA próximos ao polímero CMC puro.

*Ghanbarzadeh et al. (2011)* ao incorporarem glicerol e ácido oleico em filmes de CMC também pelo método de emulsão, obtiveram valores de PVA de  $3,28 \times 10^{-7}$  g/h.m.Pa para a CMC, de  $9,62 \times 10^{-7}$  g/h.m.Pa para o filme contendo somente glicerol e  $2,41 \times 10^{-7}$  g/h.m.Pa para aquele que continha apenas o lipídio ácido oleico. Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados para os nossos sistemas uma vez que a adição do lipídio (lecitina e ácido oleico) reduziu a permeação da água pela matriz a valores próximos ao da CMC pura (*Ghanbarzadeh and Almasi 2011*). O efeito hidrofóbico da lecitina e do ácido oleico para estes filmes é maior que o efeito plastificante, assim as cadeias poliméricas podem estar parcialmente imobilizadas na interface com as partículas do lipídio, tornando as cadeias poliméricas menos móveis, reduzindo a difusividade de água através da interface das cadeias de CMC e levando a uma diminuição no PVA. Já a presença de moléculas hidrofílicas como o glicerol e o TW, aumentam o espaço entre as cadeias do polímero devido à inclusão destes entre as cadeias poliméricas, promovendo a difusividade de água na estrutura do filme. O mesmo comportamento também foi encontrado para filmes de metilcelulose plastificados com polietilenoglicol (*Turhan and Sahbaz 2004*), onde a adição do polietilenoglicol aumentou a PVA, e para filmes de goma gelana com cera de abelha e uma mistura 1:1 de ácido esteárico e ácido palmítico (*Yang and Paulson 2000*), onde a PVA diminuiu com a adição destes lipídios.

As propriedades mecânicas dos filmes de CMC foram alteradas pela adição de TC e dos surfactantes (Tabela 4). Um efeito plastificante dos filmes de CMC devido a presença de TW e lecitina foi observado. Por exemplo, a medida que a concentração dos surfactantes aumentou, ocorreu uma diminuição da rigidez do material e tenacidade dos filmes, comprovado pelo decréscimo nos valores do módulo de Young e tensão de ruptura, respectivamente. Pode-se observar também um aumento no alongamento máximo das amostras como consequência da diminuição

da rigidez do material, resultado este esperado quando agentes plastificantes são adicionados, uma vez que estes se situam entre as macromoléculas da matriz, aumentando o volume livre e a mobilidade das cadeias poliméricas. Nos resultados apresentados na Tabela 4, pode-se destacar o efeito plastificante do TW que reduziu a tensão na ruptura e aumentou o alongamento máximo até 23%, quando 70 mg de TW foram adicionadas a uma grama de CMC (filme I). A amostra N, contendo somente lecitina e TC, apresentou valores de tensão de ruptura semelhantes ao da CMC pura (filme A), porém um alongamento máximo de 18,5 %, ou seja, 2,8 vezes maior do que o filme A. O incremento no alongamento dos filmes contendo lecitina pode ser associado à característica estrutural deste surfactante. A lecitina de soja, que possui em sua estrutura o grupo fosfatidilcolina carregado positivamente, uma vez inserida entre as cadeias da matriz juntamente com o TC pode estar aumentando a mobilidade do sistema e consequentemente aumentando o alongamento dos filmes, porém a lecitina liga-se eletrostaticamente às cadeias da CMC, tornando o filme mais resistente com valores de tensões de ruptura e módulo de Young semelhantes as do polímero puro.

*Rodriguez et al. (2006)* ao estudarem os propriedades mecânicas de filmes de amido de batata com surfactantes, perceberam que os filmes de amido contendo glicerol com pequenas quantidades de lecitina apresentavam baixos valores de alongamento devido a hidrofobicidade da lecitina, porém, quando adicionados altas concentrações de lecitina, esta passa a se comportar como um plastificante aumentando o alongamento máximo do filme (Rodriguez, Oses et al. 2006). Este mesmo comportamento pode ser observado para o filme N, quando a lecitina em sua concentração máxima adicionada apenas com o TC no filme de CMC aumenta os valores de alongamento quando comparados ao polímero puro (filme A).

De acordo com a análise estatística de Tukey ( $p < 0,05$ ) dos dados referentes ao módulo de young para os filmes analisados por ensaios de tração, a rigidez dos filmes de CMC pura foram significativamente diferentes daqueles obtidos na presença de aditivos. Efetivamente, TW, TC e lecitina agiram como pseudo-surfactantes diminuindo a rigidez do material.

Com relação à tensão de ruptura, o teste estatístico de Tukey ( $p < 0,05$ ) revelou que os valores para o filme N, contendo apenas TC e lecitina, foram similares aos do filme A com CMC pura. Pela mesma análise estatística, foi observado que os valores referentes ao

alongamento máximo dos filmes B, C, D, E e F foram estatisticamente similares aos do filme de A com o polímero puro.



**Tabela 4:** Propriedades mecânicas e PVA dos filmes de CMC com TC e surfactantes.

| Amstras | PVA x10 <sup>7</sup><br>(g/h.m.Pa) | Módulo de Young<br>(MPa)          | Tensão Ruptura<br>(MPa)   | Alongamento<br>máximo (%)   |
|---------|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| A       | 4,02 ± 0,49 <sup>(a)</sup>         | 2719 ± 234 <sup>(a)</sup>         | 56 ± 6 <sup>(a)</sup>     | 6,5 ± 2,0 <sup>(a)</sup>    |
| B       | 8,89 ± 0,89 <sup>(b)</sup>         | 2350 ± 22 <sup>(b)</sup>          | 35 ± 8 <sup>(b,c)</sup>   | 4,9 ± 2,8 <sup>(a)</sup>    |
| C       | 7,78 ± 1,54 <sup>(b,c,d)</sup>     | 2185 ± 190 <sup>(b,c)</sup>       | 39 ± 5 <sup>(d,e,f)</sup> | 6,9 ± 2,7 <sup>(a)</sup>    |
| D       | 9,08 ± 0,93 <sup>(b)</sup>         | 1950 ± 135 <sup>(c,d,e,f,g)</sup> | 30 ± 4 <sup>(b,c)</sup>   | 4,6 ± 2,7 <sup>(a)</sup>    |
| E       | 7,63 ± 1,27 <sup>(b,c,d)</sup>     | 2129 ± 147 <sup>(b,c,g)</sup>     | 34 ± 3 <sup>(c,d)</sup>   | 6,9 ± 1,9 <sup>(a)</sup>    |
| F       | 6,98 ± 1,39 <sup>(a,b,c,d,e)</sup> | 1828 ± 200 <sup>(d,e)</sup>       | 24 ± 5 <sup>(b)</sup>     | 4,1 ± 1,7 <sup>(a)</sup>    |
| G       | 7,26 ± 0,35 <sup>(b,c,d,e)</sup>   | 1957 ± 189 <sup>(c,d,e,f,g)</sup> | 40 ± 6 <sup>(d,e,f)</sup> | 18,8 ± 3,0 <sup>(b,c)</sup> |
| H       | 8,60 ± 0,86 <sup>(b,d)</sup>       | 2041 ± 115 <sup>(d,e,f,g)</sup>   | 40 ± 5 <sup>(d,e,f)</sup> | 13,9 ± 4,5 <sup>(d)</sup>   |
| I       | 8,77 ± 0,40 <sup>(b,d)</sup>       | 1875 ± 130 <sup>(d,e,f)</sup>     | 44 ± 3 <sup>(f,g)</sup>   | 23,0 ± 1,3 <sup>(c,e)</sup> |
| J       | 5,79 ± 0,14 <sup>(a,c,d,e)</sup>   | 1898 ± 189 <sup>(d,e,f,g)</sup>   | 41 ± 4 <sup>(d,e,f)</sup> | 14,3 ± 2,0 <sup>(b,d)</sup> |
| K       | 4,61 ± 0,22 <sup>(a,e)</sup>       | 1969 ± 76 <sup>(c,d,e,f,g)</sup>  | 44 ± 6 <sup>(e,f,g)</sup> | 18,5 ± 5,0 <sup>(b,c)</sup> |
| L       | 5,36 ± 1,52 <sup>(a,c,e)</sup>     | 1905 ± 126 <sup>(d,e,f,g)</sup>   | 46 ± 4 <sup>(f,g)</sup>   | 23,4 ± 3,5 <sup>(e)</sup>   |
| M       | 6,81 ± 1,43 <sup>(a,b,c,d,e)</sup> | 1757 ± 13 <sup>(e)</sup>          | 36 ± 5 <sup>(c,d,e)</sup> | 19,6 ± 4,0 <sup>(c,e)</sup> |
| N       | 8,07 ± 0,97 <sup>(b,c,d)</sup>     | 2113 ± 82 <sup>(b,c,f,g)</sup>    | 51 ± 4 <sup>(a,g)</sup>   | 18,5 ± 2,4 <sup>(b,c)</sup> |

\*Valores das propriedades ± desvio padrão; <sup>a-e</sup> valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa (Tukey, p < 0,05).

### 5.3.4 Análise de Cor

A cor é um parâmetro fundamental a ser avaliado em filmes e coberturas comestíveis. Segundo Chen (Chen 1995), a cor e a opacidade do polímero é consequência da morfologia ou da estrutura química relacionada à massa molecular do material. Filmes de carboximetilcelulose são transparentes e homogêneos. No entanto, a adição de lipídios muda a aparência de filmes de hidrocolóides deixando-os opacos (Kamper and Fennema 1984)

Um dos principais instrumentos utilizados para medição de cor são os colorímetros onde estes medem de maneira direta a cor de um objeto usando filtros que reproduzem a resposta do olho humano, por isso estes aparelhos são considerados simples fornecendo dados rápidos (Prado 2008).

O sistema CIELAB nos permite definir 3 parâmetros: o  $L^*$  que caracteriza a luminosidade, variando do branco ( $L=100$ ) ao preto ( $L=0$ ), o  $a^*$  que indica a intensidade do verde ( $-a^*$ ) ao vermelho ( $+a^*$ ) e o  $b^*$  que fornece a intensidade do azul ( $-b^*$ ) ao amarelo ( $+b^*$ ).

Quanto à luminosidade dos filmes pode-se observar na Tabela 5 que filmes são todos claros com valores de  $L^*$  próximos de 100. De acordo com a análise de Tukey ( $p < 0,05$ ) o filme E, com TW e TC, é o único que apresenta diferença significativa na luminosidade, sendo este o filme mais escuro apresentando o menor valor de  $L^* = 94,6 \pm 0,3$  quando comparado com o filme A de CMC puro ( $L^* = 96,5 \pm 0,2$ ).

Para os valores que representam as variações de cor do verde ao vermelho ( $a^*$ ) os resultados mostram que os filmes variaram entre  $0,07 \pm 0,0$  para a amostra C (contendo apenas TW), a  $-0,21 \pm 0,08$  para a amostra N, porém todas muito próximas de zero, ou seja, sem grandes variações dos filmes entre as cores vermelho e o verde. A partir da análise de Tukey ( $p < 0,05$ ) para os resultados das amostras, pode-se observar que os filmes E, M e N apresentam variações significativas nos valores de  $a^*$  em relação ao filme de CMC puro (filme A). Já os valores que representam as variações de cor do azul ao amarelo ( $b^*$ ) mostram que todos os filmes apresentaram valores de  $b^*$  positivos e maiores que a da CMC pura (filme A), o que indica uma tendência dos filmes a apresentar uma coloração amarela com a adição dos surfactantes e do TC. O teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) para esse parâmetro  $b^*$  indica que, quando comparados com o filme de CMC puro (A), os filmes B, E, F, J e M apresentam diferenças significativas para as variações de cor entre o azul e o amarelo.

Com relação à variação de cor ( $\Delta E^*$ ), os filmes variaram em relação ao filme padrão A (CMC) com valores entre  $0,4 \pm 0,3$  a  $3,8 \pm 0,8$ . Artigos científicos relatam que de acordo com a aplicação, valores de  $\Delta E^*$  entre 1,5 e 3,5 são pouco distinguíveis ao olho humano, Assim, os filmes com adição de TC e os surfactantes não alteraram significativamente a variação de cor ( $\Delta E^*$ ) dos mesmos em relação a CMC pura. (Zanella, Scharf et al. 2010; Evangelista, Nardin et al. 2011)



**Tabela 5:** Valores da avaliação instrumental da cor dos filmes de CMC através do sistema CIELAB (Comission Internationale de Eclairage).

| Amostra | L*                            | a*                               | b*                             | $\Delta E^*$ |
|---------|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------|
| A       | 96,5 ± 0,2 <sup>(a,b)</sup>   | 0,02 ± 0,06 <sup>(a,b)</sup>     | 3,1 ± 0,17 <sup>(a)</sup>      | -            |
| B       | 95,3 ± 0,8 <sup>(a,c)</sup>   | 0,02 ± 0,03 <sup>(a,b)</sup>     | 6,0 ± 1,0 <sup>(b,c)</sup>     | 1,4 ± 0,5    |
| C       | 95,6 ± 0,4 <sup>(a,b,c)</sup> | 0,07 ± 0,01 <sup>(b)</sup>       | 4,2 ± 0,4 <sup>(a,d,e)</sup>   | 1,4 ± 1,0    |
| D       | 95,6 ± 0,8 <sup>(a,b,c)</sup> | -0,003 ± 0,06 <sup>(a,b,c)</sup> | 4,1 ± 0,8 <sup>(a,d,e)</sup>   | 3,8 ± 0,8    |
| E       | 94,6 ± 0,3 <sup>(c)</sup>     | -0,17 ± 0,05 <sup>(c,d)</sup>    | 6,4 ± 0,7 <sup>(c)</sup>       | 2,0 ± 0,5    |
| F       | 95,7 ± 0,3 <sup>(a,b,c)</sup> | -0,03 ± 0,08 <sup>(a,b,c)</sup>  | 4,9 ± 0,4 <sup>(b,c,d,e)</sup> | 0,4 ± 0,4    |
| G       | 96,2 ± 0,1 <sup>(a,b)</sup>   | 0,003 ± 0,03 <sup>(a,b)</sup>    | 3,2 ± 0,2 <sup>(a,d)</sup>     | 0,8 ± 0,2    |
| H       | 96,4 ± 0,3 <sup>(a,b)</sup>   | -0,01 ± 0,01 <sup>(a,b,c)</sup>  | 3,7 ± 0,4 <sup>(a,d,e)</sup>   | 0,4 ± 0,3    |
| I       | 96,8 ± 0,1 <sup>(b)</sup>     | 0,05 ± 0,02 <sup>(b)</sup>       | 3,4 ± 0,1 <sup>(a,d)</sup>     | 1,9 ± 0,1    |
| J       | 95,8 ± 0,5 <sup>(a,b,c)</sup> | -0,14 ± 0,06 <sup>(a,c,d)</sup>  | 4,8 ± 0,4 <sup>(b,c,d,e)</sup> | 1,4 ± 0,6    |
| K       | 96,5 ± 0,0 <sup>a,b</sup>     | -0,14 ± 0,08 <sup>(a,c,d)</sup>  | 4,4 ± 0,1 <sup>(a,b,d,e)</sup> | 1,5 ± 0,1    |
| L       | 96,0 ± 0,6 <sup>(a,b)</sup>   | -0,14 ± 0,07 <sup>(a,c,d)</sup>  | 4,4 ± 0,4 <sup>(a,b,d,e)</sup> | 2,1 ± 0,6    |
| M       | 96,3 ± 0,4 <sup>(a,b)</sup>   | -0,2 ± 0,06 <sup>(d)</sup>       | 5,1 ± 0,9 <sup>(b,c,e)</sup>   | 1,5 ± 0,9    |
| N       | 96,5 ± 0,7 <sup>(a,b)</sup>   | -0,21 ± 0,08 <sup>(d)</sup>      | 4,4 ± 0,8 <sup>(a,b,d,e)</sup> | 3,2 ± 0,8    |

\*Valores das propriedades ± desvio padrão; <sup>a-e</sup> valores com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ )

### 5.3.5 Testes de liberação e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) do $\alpha$ -tocoferol nos filmes de CMC.

De acordo com a análise de liberação (Tabela 6) do antioxidante TC dos filmes de CMC em etanol absoluto como simulante de alimentos gordurosos (Wessling, Nielsen et al. 1999), foi possível observar que o filme de formulação N, contendo apenas lecitina e TC apresentou valores superiores para a liberação quando comparado aos outros filmes analisados. A amostra N apresentou um máximo de liberação de  $13,7\% \pm 2,9$  em relação a quantidade total de TC adicionado na formulação em 35 dias, mantendo-se razoavelmente estável até o final da análise em 56 dias. Através da análise estatística de Tukey ( $p < 0,05$ ) a amostra N não apresenta diferença significativa entre os dias 6, 7, 14, 28, 35, 42, 49 e 56. Consequentemente a avaliação da atividade antioxidante através dos sistemas ABTS e DPPH (Tabela 7 e 8), demonstrou uma estabilidade semelhante para este filme a partir do sétimo dia de análise até o término do experimento, apresentando maior atividade aos 56 dias ( $16,6 \pm 3,2$ ) e 14 dias ( $22,5 \pm 2,6$ ), respectivamente.

Os filmes que apresentaram menor liberação (tabela 6) foram aqueles que continham em sua formulação apenas o TC e o TW (F, H e I), destacando-se o filme F com liberação máxima de  $2,4 \pm 0,0$  em 7 dias e atividade antioxidante através do método do ABTS e DPPH (Tabela 7 e 8) de  $4,3 \pm 0,3$  e  $20,1 \pm 0,9$ , respectivamente. Assim, de forma geral, a análise de tukey ( $p < 0,05$ ) não apresentou diferença significativa entre estas amostras para cada dia de análise.

Os valores superiores observados nas amostras que continham lecitina na sua formulação podem ser explicados pela maior interação entre a lecitina e o TC, como evidenciado na análise de emissão de fluorescência. Tanto a lecitina quanto o TC possuem caráter hidrofóbico, e por apresentarem pouca afinidade com a matriz polimérica hidrofílica da CMC, tendem a ser liberadas do filme com maior facilidade, uma vez que ambos são solúveis em etanol e apresentam maior afinidade neste.

Os filmes contendo somente TW e TC apresentaram valores de liberação inferiores em relação às formulações contendo lecitina. Por possuir um caráter hidrofílico, o surfactante TW, além de interagir com o TC, apresenta uma boa afinidade com a CMC, o que dificulta a liberação do antioxidante e consequentemente a atividade antioxidante do meio, tornando estas formulações mais estáveis dentro da matriz ao longo do tempo da análise.

Tabela 6: Perfil de liberação dos filmes.

| Tempo<br>(Dias) |                                | Filmes                           |                                  |                              |                                    |                              |
|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
|                 | F                              | H                                | I                                | K                            | M                                  | N                            |
| 1               | 1,8 ± 0,1 <sup>a,b-A</sup>     | 2,2 ± 0,2 <sup>a,b,c,d-A</sup>   | 2,4 ± 0,2 <sup>a,b-A</sup>       | 4,5 ± 0,7 <sup>a,b,c-B</sup> | 2,9 ± 0,2 <sup>a,b-A</sup>         | 4,8 ± 0,8 <sup>a-B</sup>     |
| 2               | 1,42 ± 0,2 <sup>a,c,d-A</sup>  | 1,7 ± 0,2 <sup>a,b,c-A</sup>     | 1,7 ± 0,2 <sup>c,d,e,f-A</sup>   | 4,0 ± 0,8 <sup>a,b,c-B</sup> | 3,3 ± 0,7 <sup>a,b,c-B</sup>       | 4,6 ± 0,6 <sup>a-B</sup>     |
| 3               | 1,5 ± 0,0 <sup>a,b,c,d-A</sup> | 2,5 ± 0,2 <sup>b,c,d-B</sup>     | 1,8 ± 0,4 <sup>a,d,e,f-A,B</sup> | 4,4 ± 0,3 <sup>a,b,c-C</sup> | 3,2 ± 0,3 <sup>a,b,c-D</sup>       | 5,1 ± 0,1 <sup>a,b-E</sup>   |
| 4               | 1,9 ± 0,3 <sup>b-A</sup>       | 2,7 ± 0,5 <sup>d-A</sup>         | 2,0 ± 0,0 <sup>a,f-A</sup>       | 5,0 ± 0,6 <sup>b,c-B</sup>   | 4,9 ± 1,0 <sup>c,d,e-B</sup>       | 4,5 ± 0,2 <sup>a-B</sup>     |
| 5               | 1,8 ± 0,2 <sup>a,b,d-A</sup>   | 2,1 ± 0,4 <sup>a,b,c,d-A</sup>   | 2,0 ± 0,1 <sup>a,e,f-A</sup>     | 5,2 ± 0,4 <sup>b,c-B</sup>   | 4,1 ± 0,6 <sup>a,b,c,d,e-B</sup>   | 4,9 ± 0,8 <sup>a,b-B</sup>   |
| 6               | 1,2 ± 0,0 <sup>c-A</sup>       | 2,1 ± 0,4 <sup>a,b,c,d-A</sup>   | 1,4 ± 0,2 <sup>d-A</sup>         | 5,2 ± 0,8 <sup>b,c-B</sup>   | 3,7 ± 0,2 <sup>a,b,c,d-C</sup>     | 9,3 ± 0,9 <sup>b,c,d-D</sup> |
| 7               | 2,4 ± 0,0 <sup>e-A</sup>       | 2,6 ± 0,6 <sup>c,d-A</sup>       | 2,7 ± 0,1 <sup>b-A</sup>         | 4,6 ± 0,1 <sup>b,c-A</sup>   | 2,8 ± 0,4 <sup>a-A</sup>           | 11,9 ± 2,5 <sup>d-B</sup>    |
| 14              | 1,9 ± 0,1 <sup>b-A</sup>       | 5,5 ± 0,2 <sup>e-B</sup>         | 2,0 ± 0,0 <sup>a,e,f-A</sup>     | 2,5 ± 0,4 <sup>a-A</sup>     | 3,5 ± 0,2 <sup>a,b,c,d-A</sup>     | 12,4 ± 1,6 <sup>d-C</sup>    |
| 21              | 1,1 ± 0,1 <sup>c-A</sup>       | 2,3 ± 0,3 <sup>a,b,c,d-A</sup>   | 1,4 ± 0,3 <sup>c,d,e-A</sup>     | 3,4 ± 0,7 <sup>a,b-B</sup>   | 5,3 ± 0,7 <sup>d,e-C</sup>         | 6,7 ± 1,0 <sup>a,b,c-D</sup> |
| 28              | 1,2 ± 0,1 <sup>c-A</sup>       | 2,4 ± 0,3 <sup>a,b,c,d-A,B</sup> | 1,4 ± 0,1 <sup>c,d-A</sup>       | 4,8 ± 0,8 <sup>b,c-C</sup>   | 4,6 ± 0,5 <sup>b,c,d,e-B,C</sup>   | 10,5 ± 1,8 <sup>c,d-D</sup>  |
| 35              | 1,1 ± 0,1 <sup>c-A</sup>       | 1,8 ± 0,4 <sup>a,b,c,d-A,B</sup> | 1,3 ± 0,2 <sup>c,d-A,B</sup>     | 4,9 ± 0,1 <sup>b,c-B,C</sup> | 5,6 ± 0,9 <sup>e-C</sup>           | 13,7 ± 2,9 <sup>d-D</sup>    |
| 42              | 1,1 ± 0,0 <sup>c-A</sup>       | 1,6 ± 0,3 <sup>a,b-A,B</sup>     | 1,2 ± 0,3 <sup>c-A</sup>         | 5,1 ± 0,8 <sup>c-C</sup>     | 4,4 ± 0,3 <sup>a,b,c,d,e-B,C</sup> | 10,0 ± 2,4 <sup>c,d-D</sup>  |
| 49              | 1,3±0,3 <sup>c,d-A</sup>       | 1,8 ± 0,1 <sup>a,b,c,d-A</sup>   | 1,5 ± 0,1 <sup>c,d,e,f-A</sup>   | 4,5 ± 1,2 <sup>a,b,c-B</sup> | 4,6 ± 1,0 <sup>b,c,d,e-B</sup>     | 11,3 ± 0,8 <sup>c,d-C</sup>  |
| 56              | 1,5 ± 0,1 <sup>a,b,c,d-A</sup> | 1,4 ± 0,1 <sup>a-A</sup>         | 1,3 ± 0,3 <sup>c,d-A</sup>       | 3,6 ± 0,1 <sup>a,b-B</sup>   | 4,2 ± 0,2 <sup>a,b,c,d,e-B</sup>   | 11,6 ± 1,4 <sup>d-C</sup>    |

\*\*\*% de liberação gTC/gCMC, média ± desvio padrão (n=3).

\*\*Valores das propriedades ± desvio padrão; <sup>a-e</sup> valores com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa (Tukey, p < 0,05)

\*\*\*Letras minúsculas representam a análise de tukey para cada filme variando com o tempo (mesma coluna), e letras maiúsculas representam a análise de tukey de todos os filmes analisados para determinado tempo (mesma linha).

**Tabela 7:** Atividade antioxidante da solução da análise de liberação dos filmes em etanol, determinada pelos sistemas e ABTS.

| Tempo<br>(Dias) |                                | Filmes                     |                            |                                  |                                |                                |
|-----------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| F               |                                | H                          | I                          | K                                | M                              | N                              |
| 1               | 2,1 ± 0,4 <sup>a-b-A</sup>     | 2,9 ± 0,4 <sup>a-A</sup>   | 3,0 ± 0,4 <sup>a-b-A</sup> | 5,6 ± 1,1 <sup>a-b,c-d-B</sup>   | 4,3 ± 0,8 <sup>a-b-A,B</sup>   | 5,8 ± 1,2 <sup>a-b,c-B</sup>   |
| 2               | 2,6 ± 0,3 <sup>a-b,c-A</sup>   | 3,1 ± 0,2 <sup>a-A</sup>   | 2,5 ± 0,3 <sup>a-A</sup>   | 5,0 ± 0,8 <sup>a-b,c-B</sup>     | 4,8 ± 0,7 <sup>a-b-B</sup>     | 5,7 ± 0,4 <sup>a-b-B</sup>     |
| 3               | 4,3 ± 0,3 <sup>d-A,B</sup>     | 4,0 ± 0,6 <sup>a-b-B</sup> | 3,8 ± 0,4 <sup>a-b-A</sup> | 5,5 ± 0,6 <sup>a-b,c-d-C,D</sup> | 4,3 ± 0,4 <sup>a-b-B,C</sup>   | 6,0 ± 0,4 <sup>a-b,c-D</sup>   |
| 4               | 3,7 ± 0,7 <sup>c-d-e-A,B</sup> | 3,9 ± 0,4 <sup>a-b-B</sup> | 2,6 ± 0,3 <sup>a-B</sup>   | 5,0 ± 0,5 <sup>a-b,c-A</sup>     | 5,0 ± 1,0 <sup>a-b-A</sup>     | 5,3 ± 0,6 <sup>a-A</sup>       |
| 5               | 2,3 ± 0,1 <sup>a-b,c-A</sup>   | 3,6 ± 0,3 <sup>a-b-B</sup> | 4,1 ± 0,4 <sup>b-B,C</sup> | 6,4 ± 0,9 <sup>b,c-d-e-D</sup>   | 5,0 ± 0,5 <sup>a-b-B,C,D</sup> | 6,0 ± 1,0 <sup>a-b,c-C,D</sup> |
| 6               | 1,5 ± 0,3 <sup>a-A</sup>       | 4,0 ± 0,7 <sup>a-B</sup>   | 3,9 ± 0,5 <sup>b-B</sup>   | 3,0 ± 0,3 <sup>a-B</sup>         | 4,0 ± 0,7 <sup>a-b-C</sup>     | 5,4 ± 0,8 <sup>a-b-C</sup>     |
| 7               | 2,7 ± 0,6 <sup>a-b,c-A</sup>   | 4,0 ± 0,9 <sup>a-b-B</sup> | 3,0 ± 0,3 <sup>a-b-A</sup> | 6,9 ± 1,2 <sup>c-d-e-B</sup>     | 5,7 ± 1,2 <sup>a-b,c-A,B</sup> | 13,2 ± 2,7 <sup>d-e-C</sup>    |
| 14              | 4,2 ± 0,7 <sup>d-e-A</sup>     | 3,7 ± 0,7 <sup>a-A</sup>   | 3,0 ± 0,6 <sup>a-b-A</sup> | 3,6 ± 0,3 <sup>a-b-A</sup>       | 5,2 ± 0,1 <sup>a-b-A</sup>     | 13,5 ± 2,5 <sup>d-e-B</sup>    |
| 21              | 4,1 ± 0,9 <sup>d-e-A</sup>     | 3,9 ± 0,8 <sup>a-A</sup>   | 2,9 ± 0,6 <sup>a-b-A</sup> | 3,8 ± 0,7 <sup>a-b-A</sup>       | 4,4 ± 1,0 <sup>a-b-A</sup>     | 10,6 ± 1,8 <sup>b-c-d-B</sup>  |
| 28              | 2,8 ± 0,6 <sup>a-b,c-e-A</sup> | 3,6 ± 0,3 <sup>a-A</sup>   | 3,3 ± 0,4 <sup>a-b-A</sup> | 7,9 ± 1,4 <sup>c-d-e-B</sup>     | 6,8 ± 1,2 <sup>b-c-B</sup>     | 11,0 ± 1,2 <sup>c-d-C</sup>    |
| 35              | 3,0 ± 0,4 <sup>b,c,d-e-A</sup> | 2,8 ± 0,4 <sup>a-A</sup>   | 3,1 ± 0,2 <sup>a-b-A</sup> | 8,2 ± 0,8 <sup>d-e-B</sup>       | 5,3 ± 0,5 <sup>a-b-A,B</sup>   | 13,9 ± 2,4 <sup>d-e-C</sup>    |
| 42              | 2,1 ± 0,1 <sup>a-b-A</sup>     | 3,0 ± 0,6 <sup>a-A</sup>   | 2,8 ± 0,3 <sup>a-b-A</sup> | 8,8 ± 1,4 <sup>e-B</sup>         | 8,3 ± 1,2 <sup>c-B</sup>       | 11,5 ± 2,3 <sup>d-e-B</sup>    |
| 49              | 1,9 ± 0,3 <sup>a-b-A</sup>     | 2,7 ± 0,5 <sup>a-A</sup>   | 3,0 ± 0,3 <sup>a-b-A</sup> | 8,2 ± 1,5 <sup>d-e-B</sup>       | 5,7 ± 1,2 <sup>a-b,c-B</sup>   | 15,3 ± 1,0 <sup>d-e-C</sup>    |
| 56              | 2,7 ± 0,4 <sup>a-b,c-A</sup>   | 2,9 ± 0,4 <sup>a-A</sup>   | 4,0 ± 0,6 <sup>b-A</sup>   | 5,4 ± 1,3 <sup>a-b,c-d-A</sup>   | 5,8 ± 1,0 <sup>a-b-c-A</sup>   | 16,6 ± 3,2 <sup>e-B</sup>      |

\*Capacidade Antioxidante - µmol TEAC/g (atividade antioxidante equivalente em Trolox) de peso seco (ABTS), média ± desvio padrão (n=3).

\*\*Valores das propriedades ± desvio padrão; <sup>a-e</sup> valores com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa (Tukey, p < 0,05)

\*\*\*Letras minúsculas representam a análise de tukey para cada filme variando com o tempo, e letras maiúsculas representam a análise de tukey de todos os filmes analisados para determinado tempo.



**Tabela 8:** Atividade antioxidante da solução da análise de liberação dos filmes em etanol, determinada pelos sistemas e DPPH

| Tempo<br>(Dias) |                                  | Filmes                         |                             |                                  |                              |                               |   |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---|
|                 |                                  | F                              | H                           | I                                | K                            | M                             | N |
| 1               | 2,8 ± 0,3 <sup>aA</sup>          | 3,1 ± 0,4 <sup>ab,c-A</sup>    | 3,7 ± 0,2 <sup>a,bAB</sup>  | 5,7 ± 0,5 <sup>ab,c,d,CD</sup>   | 5,1 ± 0,8 <sup>ab,B,C</sup>  | 7,2 ± 1,0 <sup>a,b,E</sup>    |   |
| 2               | 3,9 ± 0,7 <sup>b-A</sup>         | 6,1 ± 0,1 <sup>c,d-A</sup>     | 6,3 ± 0,2 <sup>b,c,AB</sup> | 9,4 ± 1,7 <sup>ef,C</sup>        | 8,9 ± 1,3 <sup>c,d,B,C</sup> | 11,3 ± 0,9 <sup>b,c,d,C</sup> |   |
| 3               | 0,7 ± 0,1 <sup>c,d-A</sup>       | 1,5 ± 0,2 <sup>a-A</sup>       | 1,3 ± 0,3 <sup>a-A</sup>    | 4,3 ± 0,6 <sup>ab,B</sup>        | 1,8 ± 0,3 <sup>e-A</sup>     | 4,1 ± 0,5 <sup>a-B</sup>      |   |
| 4               | 5,8 ± 0,2 <sup>a-A</sup>         | 7,1 ± 0,7 <sup>d,AB</sup>      | 6,3 ± 0,1 <sup>b,c-A</sup>  | 10,9 ± 1,0 <sup>f,C</sup>        | 9,9 ± 1,9 <sup>d,C</sup>     | 9,5 ± 0,3 <sup>ab,c,B-C</sup> |   |
| 5               | 1,6 ± 0,3 <sup>c,d,f,g-A</sup>   | 1,9 ± 0,1 <sup>a,b-A</sup>     | 1,3 ± 0,2 <sup>a-A</sup>    | 7,5 ± 0,1 <sup>c,d,e,g,B</sup>   | 8,6 ± 0,8 <sup>c,d,B,C</sup> | 9,5 ± 1,4 <sup>ab,c-C</sup>   |   |
| 6               | 1,4 ± 0,2 <sup>c,d,f,g-A</sup>   | 2,6 ± 0,4 <sup>ab,B</sup>      | 3,3 ± 0,3 <sup>ab,B,C</sup> | 3,7 ± 0,2 <sup>a,C,D</sup>       | 4,8 ± 0,4 <sup>ab,E</sup>    | 4,6 ± 0,4 <sup>a,D,E</sup>    |   |
| 7               | 20,1 ± 1,0 <sup>h-A,B</sup>      | 24,1 ± 4,0 <sup>e-A,B</sup>    | 26,2 ± 3,8 <sup>d-B</sup>   | 8,1 ± 1,5 <sup>d,e,f,g-C</sup>   | 5,9 ± 0,9 <sup>ab,f-C</sup>  | 18,2 ± 1,5 <sup>e,f-A</sup>   |   |
| 14              | 1,8 ± 0,2 <sup>a,d,f,g-A</sup>   | 5,2 ± 0,8 <sup>b,c,d-A</sup>   | 2,7 ± 0,2 <sup>a-A</sup>    | 10,9 ± 1,3 <sup>f,B</sup>        | 10,3 ± 1,3 <sup>d,B</sup>    | 22,5 ± 2,6 <sup>f-C</sup>     |   |
| 21              | 2,0 ± 0,5 <sup>a,g,AB</sup>      | 1,8 ± 0,1 <sup>a-A</sup>       | 2,6 ± 0,4 <sup>a-AB,C</sup> | 3,8 ± 1,0 <sup>b-C</sup>         | 3,6 ± 0,4 <sup>a,c,B,C</sup> | 8,0 ± 0,8 <sup>a,b-D</sup>    |   |
| 28              | 5,8 ± 0,3 <sup>e-A</sup>         | 7,3 ± 0,8 <sup>d-A</sup>       | 7,6 ± 0,3 <sup>d-A</sup>    | 8,7 ± 0,5 <sup>e,f,g-A</sup>     | 5,1 ± 0,7 <sup>ab-A</sup>    | 20,1 ± 5,9 <sup>ef,B</sup>    |   |
| 35              | 1,2 ± 0,2 <sup>c,d,f,g-A,B</sup> | 0,9 ± 0,0 <sup>a-A</sup>       | 1,1 ± 0,1 <sup>a-AB</sup>   | 5,0 ± 0,4 <sup>ab,c-C</sup>      | 4,8 ± 1,1 <sup>ab,B,C</sup>  | 18,1 ± 3,1 <sup>ef,D</sup>    |   |
| 42              | 1,9 ± 0,2 <sup>a,f,g-A</sup>     | 2,8 ± 0,5 <sup>a,b,c-A,B</sup> | 3,4 ± 0,3 <sup>ab-A,B</sup> | 7,0 ± 1,1 <sup>b,c,d,e,g-C</sup> | 10,7 ± 1,4 <sup>d,D</sup>    | 4,3 ± 0,9 <sup>a-B</sup>      |   |
| 49              | 0,8 ± 0,2 <sup>c,d,f-A</sup>     | 0,4 ± 0,0 <sup>a-A</sup>       | 1,2 ± 0,3 <sup>a-A</sup>    | 4,1 ± 0,8 <sup>ab,B</sup>        | 4,5 ± 0,7 <sup>ab,e-B</sup>  | 15,9 ± 2,1 <sup>c,d,e-C</sup> |   |
| 56              | 0,6 ± 0,1 <sup>c-A</sup>         | 0,7 ± 0,2 <sup>a-A</sup>       | 2,2 ± 0,3 <sup>a-A</sup>    | 6,0 ± 1,1 <sup>ab,c,d,g-B</sup>  | 6,5 ± 0,4 <sup>b,c,f-B</sup> | 16,1 ± 1,5 <sup>d,e,f-C</sup> |   |

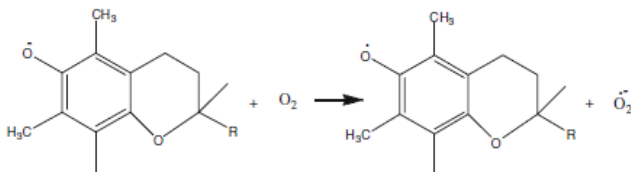
\*Capacidade Antioxidante - µmol TEAC/g (atividade antioxidante equivalente em Trolox) de peso seco (DPPH), média ± desvio padrão (n=3).

\*\*Valores das propriedades ± desvio padrão; <sup>a-e</sup> valores com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa (Tukey, p < 0,05)

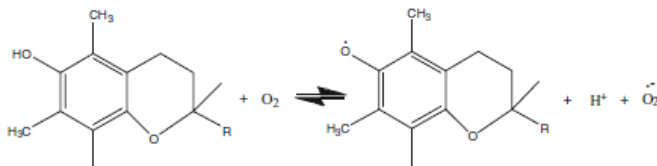
\*\*\*Letras minúsculas representam a análise de tukey para cada filme variando com o tempo, e letras maiúsculas representam a análise de tukey de todos os filmes analisados para determinado tempo.

Outra hipótese para os baixos valores de liberação e atividade antioxidante dos filmes pode estar relacionada com a instabilidade do TC, uma vez que o antioxidante pode estar degradando após ser liberado do filme para solução alcoólica, devido à quantidade de  $O_2$  dissolvido no solvente. Sabliov et al. (2009) mostraram que o TC é estável a altas temperaturas sem a presença de oxigênio e protegido da luz, mas em condições atmosféricas, o grau de oxidação do meio aumenta levando à degradação deste. Os autores relataram que a degradação do antioxidante se dá não só pela exposição à luz, como também em contato com o  $O_2$  do ar atmosférico e pela presença do gás  $O_2$  dissolvido nos solventes (metanol e hexano) (Sabliov, Fronczek et al. 2009).

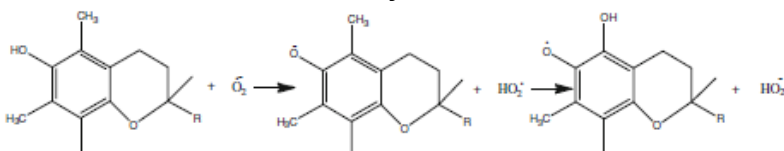
Assim, a quantidade de oxigênio dissolvido em solventes orgânicos, é um dos principais fatores que justificam a degradação do TC dissolvido no meio, neste caso, fica claro que quanto maior a quantidade de oxigênio dissolvido no solvente maior será a degradação do TC em solução. Conforme a reação 1 (Figura 22), o TC se dissocia em solventes orgânicos formando um ânion que pode oxidar na presença de oxigênio dissolvido, resultando na formação do radical do TC e do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Na presença de oxigênio atmosférico, o TC geralmente se degrada, porém mais lentamente, através da reação 2 (Figura 22), onde o radical superóxido também é formado. Por fim (Figura 22 - reação 3), ocorre a interação adicional do radical superóxido, produto da reação 1 e 2, com o TC. O radical  $HO_2^{\cdot}$  é de certa forma, mais reativo do que o radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$ , podendo ainda interagir com o TC acelerando a degradação do antioxidante (Sabliov, Fronczek et al. 2009).



Reação 1



Reação 2



Reação 3

**Figura 22:** Possíveis reações de oxidação do TC na presença de  $\text{O}_2$ . (Sabliov, Fronczek et al. 2009)

No estudo da liberação e atividade antioxidante dos filmes de CMC com TC, a possível degradação do antioxidante, constatada pelos baixos valores obtidos nos experimentos, pode ser explicada pelas três reações da Figura 22. Uma vez que o ar atmosférico não foi removido dos frascos de análise, levando à oxidação através da reação 2, além da degradação resultante do oxigênio dissolvido no etanol (reação 1). A reação 3, como explicado anteriormente, acelera o processo de degradação e ocorre como consequência das reações 1 e 2.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados encontrados neste estudo, podem-se fazer as seguintes considerações:

- ✓ O método de preparação dos filmes foi eficiente, já que as emulsões formadas se mostraram estáveis bem como os filmes foram reprodutíveis.
- ✓ Através da análise de fluorescência pode-se comprovar a estabilidade durante o período de 8 semanas do TC incorporado nos filmes de CMC.
- ✓ O filme N (sem a presença de TW), apesar de apresentar uma boa estabilidade, apresentou intensidade de fluorescência mais baixa quando comparado aos outros filmes pela possível formação de vesículas.
- ✓ A análise morfológica (MEV) dos filmes revelou que os filmes de CMC puro apresentaram-se homogêneos, enquanto que os filmes contendo CMC com TC (filme B) sem os surfactantes apresentaram separação de fase.
- ✓ A análise da morfologia da fratura criogênica dos filmes com TW e lecitina apresentaram cavidades em suas estruturas atribuídas aos espaços ocupados pelo TC na matriz. Para os filmes com TW estas cavidades apresentaram-se maiores que nos filmes onde havia também a incorporação da lecitina. No filme N, sem a presença de TW, as cavidades não foram observadas.
- ✓ Os filmes contendo TC (filme B) apresentaram maior permeabilidade ao vapor de água (PVA) quando comparado ao filme de CMC puro (amostra A) devido às cavidades formadas pela separação de fase. Os filmes contendo TW também aumentaram a PVA na matriz polimérica em função do efeito plastificante deste surfactante que pode ser confirmado através do decaimento do módulo de elasticidade e aumento do alongamento máximo das amostras contendo este surfactante. Já os filmes que apresentam lecitina em sua composição reduziram a PVA a valores próximos ao da CMC pura, comportamento associado ao efeito da lecitina na redução do tamanho das micelas de TC formadas, anulando ou reduzindo dessa forma o efeito plastificante do TW.
- ✓ As propriedades mecânicas dos filmes de CMC foram alteradas pela adição de TC e dos surfactantes, devido ao efeito plastificante observado. Com o aumento da concentração dos

surfactantes, houve uma diminuição da rigidez do material e tenacidade dos filmes, comprovado pelo decréscimo nos valores do módulo de Young e tensão de ruptura, e como consequência, ocorreu um aumento no alongamento máximo.

- ✓ A partir da análise de cor foi possível observar que os filmes são todos claros com valores de  $L^*$  próximos de 100. Os filmes com adição de TC e dos surfactantes apresentaram valores de  $b^*$  positivos e um pouco maiores que a da CMC pura, indicando uma tendência dos filmes a apresentar uma coloração amarela.
- ✓ A análise de liberação mostrou que o filme N, contendo apenas TC e lecitina, apresentou valores superiores para a liberação do TC comparado aos outros filmes analisados e mantendo-se razoavelmente estável até o final da análise. Consequentemente a avaliação da atividade antioxidante para este filme, através dos sistemas ABTS e DPPH, demonstrou uma estabilidade semelhante.
- ✓ A análise de liberação e atividade antioxidante apresentou valores superiores para as amostras que continham lecitina em sua formulação que pode ser explicada pela interação entre a lecitina e o TC e sua afinidade com o etanol. Já os filmes contendo somente TW apresentaram valores de liberação inferiores e podem ser explicados devido à interação do surfactante TW com o TC e uma boa afinidade com a CMC, dificultando a liberação do antioxidante e consequentemente a atividade antioxidante do meio, tornando estas formulações mais estáveis dentro da matriz ao longo do tempo da análise.
- ✓ Outra hipótese para os baixos valores de liberação e atividade antioxidante dos filmes pode estar relacionada com a instabilidade do antioxidante TC, que pode estar degradando após ser liberado do filme para solução alcoólica, devido à quantidade de  $O_2$  dissolvido no solvente.

## REFERÊNCIAS

- Al-Malaika, S.; Goodwin, C.; Issenhuth, S.; Burdick, D. The antioxidant role of alpha-tocopherol in polymers II. Melt stabilising effect in polypropylene. **Polymer Degradation and Stability**, *64*, p. 145-156, 1999.
- Araújo, J.M.A. *Química de Alimentos - Teoria e Prática*. Viçosa-MG: Editora UFV, 2008.
- Atkinson, J.; Epand, R.F.; Epand, R.M. Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. **Free Radical Biology and Medicine**, *44*, p. 739-764, 2008.
- Biswal, D.R.; Singh, R.P. Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. **Carbohydrate Polymers**, *57*, p. 379-387, 2004.
- Borneo, R.; Leon, A.E.; Aguirre, A.; Ribotta, P.; Cantero, J.J. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Cordoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. **Food Chemistry**, *112*, p. 664-670, 2009.
- Byun, Y.; Hwang, J.B.; Bang, S.H.; Darby, D.; Cooksey, K.; Dawson, P.L.; Park, H.J.; Whiteside, S. Formulation and characterization of alpha-tocopherol loaded poly epsilon-caprolactone (PCL) nanoparticles. **Lwt-Food Science and Technology**, *44*, p. 24-28, 2011.
- Campanella, L.; Pacifici, F.; Sammartino, M.P.; Tomassetti, M. A new organic phase bienzymatic electrode for lecithin analysis in food products. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, *47*, p. 25-38, 1998.
- Chen, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, *78*, p. 2563-2583, 1995.
- Cheong, J.N.; Tan, C.P.; Man, Y.B.C.; Misran, M. alpha-tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. **Journal of Food Engineering**, *89*, p. 204-209, 2008.
- Ching, L.S.; Mohamed, S. Alpha-tocopherol content in 62 edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *49*, p. 3101-3105, 2001.
- Cirkel, P.A.; Fontana, M.; Koper, G.J.M. Carotenoids as end-cap-active agents in lecithin cylindrical micelles. **Langmuir**, *15*, p. 3026-3028, 1999.
- Corsetti, A.; Gobetti, M.; De Marco, B.; Balestrieri, F.; Paoletti, F.; Russi, L.; Rossi, J. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *48*, p. 3044-3051, 2000.

- Daher, C.F.;Baroody, G.M.; Howland, R.J. Effect of a surfactant, Tween 80, on the formation and secretion of chylomicrons in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, 41, p. 575-582, 2003.
- Debeaufort, F.; Voilley, A. Effect of surfactants and drying rate on barrier properties of emulsified edible films. **International Journal of Food Science & Technology**, 30, p. 183-190, 1995.
- Diaz-Sobac, R.;Garcia, H.;Beristain, C.I.; Vernon-Carter, E.J. Morphology and water vapor permeability of emulsion films based on mesquite gum. **Journal of Food Processing and Preservation**, 26, p. 129-141, 2002.
- Eitenmiller, R.; Lee, J. *Vitamin E: Food Chemistry Composition, and Analysis* (1 edição ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., 2004.
- Evangelista, R. M., I. Nardin, et al. Nutritional quality and postharvest greening of tubers from potato cultivars. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. 46(8): 953-960, 2011.
- Ferrari, C.K.B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Revista de Nutrição*, 11, p. 3-14, 1998.
- Ferreira, V.F.;Rocha, D.R.d.; Silva, F.d.C.d. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, 32, p. 623-638, 2009.
- Friberg, S.E.;Larsson, K.; Sjoblom, J. Food Emulsions:Fourth Edition, Revised and Expanded. In 4 edição ed.). New York: Marcel Dekker, Inc., (2004).
- Fujimoto, J.;Reis, E.A.d.O.;Petri, D.F.S.; Filho, S.P.C. Formação de multicamadas se polissacarídeos e proteína. **Química Nova**, 25, p. 757-761, 2002.
- Ghanbarzadeh, B.; Almasi, H. Physical properties of edible emulsified films based on carboxymethyl cellulose and oleic acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, 48, p. 44-49, 2011.
- Ghanbarzadeh, B.;Almasi, H.; Entezami, A.A. Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. **Industrial Crops and Products**, 33, p. 229-235, 2011.
- Gujral, H.S.;Guardiola, I.;Carbonell, J.V.; Rosell, C.A. Effect of cyclodextrinase on dough rheology and bread quality from rice flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, p. 3814-3818, 2003.
- Hollabaugh, C.B.;Burt, L.H.; Walsh, A.P. CARBOXYMETHYLCELLULOSE - USES AND APPLICATIONS. **Industrial and Engineering Chemistry**, 37, p. 943-947, 1945.



- Holownia, K.I.; Erickson, M.C.; Chinnan, M.S.; Eitenmiller, R.R. Tocopherol losses in peanut oil during pressure frying of marinated chicken strips coated with edible films. **Food Research International**, 34, p. 77-80, 2001.
- Hunter, R.J. *Introduction to Modern Colloid Science* (1 edição ed.). New York: Oxford University Press, 1993.
- Ibrahim, A.A.; Adel, A.M.; Abd El-Wahab, Z.H.; Al-Shemy, M.T. Utilization of carboxymethyl cellulose based on bean hulls as chelating agent. Synthesis, characterization and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, 83, p. 94-115, 2011.
- Jongjareonrak, A.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Tanaka, M. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and alpha-tocopherol. **Food Hydrocolloids**, 22, p. 449-458, 2008.
- Kamper, S.L.; Fennema, O. WATER-VAPOR PERMEABILITY OF AN EDIBLE, FATTY-ACID, BILAYER FILM. **Journal of Food Science**, 49, p. 1482-1485, 1984.
- Kim, D.O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, p. 3713-3717, 2002.
- Koontz, J.L.; Moffitt, R.D.; Marcy, J.E.; O'Keefe, S.F.; Duncan, S.E.; Long, T.E. Controlled release of -tocopherol, quercetin, and their cyclodextrin inclusion complexes from linear low-density polyethylene (LLDPE) films into a coconut oil model food system. **Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, 27, p. 1598-1607, 2010.
- Kranl, K.; Schlesier, K.; Bitsch, R.; Hermann, H.; Rohe, M.; Bohm, V. Comparing antioxidative food additives and secondary plant products - use of different assays. **Food Chemistry**, 93, p. 171-175, 2005.
- Kuligowski, J.; Quintas, G.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. Determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements using partial least squares-Fourier transform infrared spectroscopy. **Talanta**, 77, p. 229-234, 2008.
- LaCoste, A.; Schaich, K.M.; Zumbrennen, D.; Yam, K.L. Advancing controlled release packaging through smart blending. **Packaging Technology and Science**, 18, p. 77-87, 2005.
- Lee, K.G.; Shibamoto, T. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, p. 4947-4952, 2002.

- Lee, Y.S.;Shin, H.S.;Han, J.K.;Lee, M.; Giacin, J.R. Effectiveness of antioxidant-impregnated film in retarding lipid oxidation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 84, p. 993-1000, 2004.
- Li, W.;Sun, B.J.; Wu, P.Y. Study on hydrogen bonds of carboxymethyl cellulose sodium film with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, 78, p. 454-461, 2009.
- Lucas, E.F.;Soares, B.G.; Monteiro, E.E.C. *Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*. Rio de Janeiro: E-papers Editora, 2001.
- Luzia, D.M.M.; Jorge, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, 32, p. 946-949, 2009.
- Montero, D.;Marrero, M.;Izquierdo, M.S.;Robaina, L.;Vergara, J.M.; Tort, L. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. **Aquaculture**, 171, p. 269-278, 1999.
- Moure, A.;Cruz, J.M.;Franco, D.;Dominguez, J.M.;Sineiro, J.;Dominguez, H.;Nunez, M.J.; Parajo, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, 72, p. 145-171, 2001.
- Nerin, C.;Tovar, L.;Djenane, D.;Camo, J.;Salafranca, J.;Beltran, J.A.; Roncales, P. Stabilization of beef meat by a new active packaging containing natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, p. 7840-7846, 2006.
- Pensabene, J.W.;Fiddler, W.;Doerr, R.C.;Lakritz, L.; Wasserman, A.E. FORMATION OF DIMETHYLNITROSAMINE FROM COMMERCIAL LECITHIN AND ITS COMPONENTS IN A MODEL SYSTEM. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 23, p. 979-980, 1975.
- Prado, A.C.P.d. *Avaliação da atividade antioxidante da casca e torta de noz-pecã [Carya illinoensis (Wangenh) C. Koch]* UFSC, Florianópolis, (2008).
- Re, R.;Pellegrini, N.;Proteggente, A.;Pannala, A.;Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26, p. 1231-1237, 1999.
- Rodriguez, M.;Osés, J.;Ziani, K.; Mate, J.I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. **Food Research International**, 39, p. 840-846, 2006.
- Sabliov, C.M.;Fronczek, C.;Astete, C.E.;Khachatryan, M.;Khachatryan, L.; Leonardi, C. Effects of Temperature and UV Light

- on Degradation of alpha-Tocopherol in Free and Dissolved Form. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 86, p. 895-902, 2009.
- Sarantópoulos, C.;Oliveira, L.;Padula, M.;Coltro, L.;Alves, R.; Garcia, E. Taxa de permeabilidade ao vapor d'água de filmes e embalagens flexíveis por método gravimétrico. In *Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades*, (pp. 189-195). Campinas: CETEA/ITAL, 2002.
- Sayanjali, S.;Ghanbarzadeh, B.; Ghiassifar, S. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. **Lwt-Food Science and Technology**, 44, p. 1133-1138, 2011.
- Shim, S.M.;Seo, S.H.;Lee, Y.;Moon, G.I.;Kim, M.S.; Park, J.H. Consumers' knowledge and safety perceptions of food additives: Evaluation on the effectiveness of transmitting information on preservatives. **Food Control**, 22, p. 1054-1060, 2011.
- Simões, S.I.;Tapadas, J.M.;Marques, C.M.;Cruz, M.E.M.;Martins, M.B.F.; Cevc, G. Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 26, p. 307-317, 2005.
- Siro, I.;Fenyvesi, E.;Szente, L.;De Meulenaer, B.;Devlieghere, F.;Orgovanyi, J.;Senyi, J.; Barta, J. Release of alpha-tocopherol from antioxidative low-density polyethylene film into fatty food simulant: Influence of complexation in beta- cyclodextrin. **Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, 23, p. 845-853, 2006.
- StAngelo, A.J. Lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 36, p. 175-224, 1996.
- Taoka, Y.;Nagano, N.;Okita, Y.;Izumida, H.;Sugimoto, S.; Hayashi, M. Effect of Tween 80 on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 111, p. 420-424, 2011.
- The, D.P.;Debeaufort, F.;Voilley, A.; Luu, D. Influence of hydrocolloid nature on the structure and functional properties of emulsified edible films. **Food Hydrocolloids**, 23, p. 691-699, 2009.
- Turhan, K.N.; Sahbaz, F. Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. **Journal of Food Engineering**, 61, p. 459-466, 2004.
- Ueno, T.;Yokota, S.;Kitaoka, T.; Wariishi, H. Conformational changes in single carboxymethylcellulose chains on a highly oriented pyrolytic

graphite surface under different salt conditions. **Carbohydrate Research**, 342, p. 954-960, 2007.

Wambura, P.;Yang, W.; Mwakatage, N. REDUCTION OF ROASTED PEANUT LIPID OXIDATIVE RANCIDITY BY POWER ULTRASOUND AND EDIBLE COATINGS CONTAINING NATURAL EXTRACTS. **Journal of Food Process Engineering**, 33, p. 883-898, 2010.

Wanasundara, P.K.P.D.; Shahidi, F. Bailey's Industrial Oil and Fat Products: Chemistry, Properties and Health Effects **Antioxidants: Science, Technology, and Applications** 6.ed., v.1, 2005.

Wambura, P.;Yang, W.; Mwakatage, N.R. Effects of Sonication and Edible Coating Containing Rosemary and Tea Extracts on Reduction of Peanut Lipid Oxidative Rancidity. **Food and Bioprocess Technology**, 4, p. 107-115, 2011.

Wang, W.;Wang, Y.J.; Wang, D.Q. Dual effects of Tween 80 on protein stability. **International Journal of Pharmaceutics**, 347, p. 31-38, 2008.

Wessling, C.;Nielsen, T.; Giacini, J.R. Antioxidant ability of BHT- and alpha-tocopherol-impregnated LDPE film in packaging of oatmeal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81, p. 194-201, 2001.

Wessling, C.;Nielsen, T.; Leufven, A. The influence of alpha-tocopherol concentration on the stability of linoleic acid and the properties of low-density polyethylene. **Packaging Technology and Science**, 13, p. 19-28, 2000.

Wessling, C.;Nielsen, T.;Leufven, A.; Jagerstad, M. Retention of alpha-tocopherol in low-density polyethylene (LDPE) and polypropylene (PP) in contact with foodstuffs and food-simulating liquids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79, p. 1635-1641, 1999.

Whitehurst, R.J. *Emulsifiers in Food Technology*. Northampton: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

Yang, L.; Paulson, A.T. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. **Food Research International**, 33, p. 571-578, 2000.

Yasar, F.;Togrul, H.; Arslan, N. Flow properties of cellulose and carboxymethyl cellulose from orange peel. **Journal of Food Engineering**, 81, p. 187-199, 2007.

Zanella, G., M. Scharf, et al. Treatment of textile dyeing baths by photofenton processes and evaluation of the reuse potentiality. **Quimica Nova** 33(5): 1039-1043, 2010.

Zhong, Y.; Li, Y.F. Effects of surfactants on the functional and structural properties of kudzu (*Pueraria lobata*) starch/ascorbic acid films. **Carbohydrate Polymers**, 85, p. 622-628, 2011.

Zhu, X.; Lee, D.; Yam, K. Release property and antioxidant effectiveness of tocopherol-incorporated LDPE/PP films. **Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, 1, p. 1-8, 2012.

Zingg, J.M. Vitamin E: An overview of major research directions. **Molecular Aspects of Medicine**, 28, p. 400-422, 2007.

Zoraida Graciano-Verdugo, A.; Soto-Valdez, H.; Peralta, E.; Cruz-Zarate, P.; Rosa Islas-Rubio, A.; Sanchez-Valdes, S.; Sanchez-Escalante, A.; Gonzalez-Mendez, N.; Gonzalez-Rios, H. Migration of alpha-tocopherol from LDPE films to corn oil and its effect on the oxidative stability. **Food Research International**, 43, p. 1073-1078, 2010.